

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS

**“RESIDUOS DE LA INDUSTRIA RICOS EN LÍPIDOS COMO MATERIA
PRIMA EN LA PRODUCCIÓN DE LIPASAS POR FERMENTACIÓN
EN ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO *Serratia marcescens*”**

QUE PRESENTA
LNU. FRANCISCO JAVIER ARANDA VALDÉS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN MICROBIOLOGÍA APLICADA

MARZO 2026

Facultad de Ciencias Químicas
Subdirección de Estudios de Posgrado



Tesis

“Residuos de la industria ricos en lípidos como materia prima en la producción de lipasas por fermentación en estado sólido utilizando *Serratia marcescens*”

Por

LNU. Francisco Javier Aranda Valdés

Como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Marzo, 2026

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



TESIS

RESIDUOS DE LA INDUSTRIA RICOS EN LÍPIDOS COMO MATERIA PRIMA EN LA
PRODUCCIÓN DE LIPASAS POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO
Serratia marcescens

POR

LNU. FRANCISCO JAVIER ARANDA VALDÉS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA APLICADA

Vo.Bo.

Dra. Melissa Marlene Rodriguez Delgado
Director

Vo.Bo.

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu
Co-Director

MARZO, 2026

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas
Subdirección de Estudios de Posgrado

“Residuos de la industria ricos en lípidos como materia prima en la producción de lipasas por fermentación en estado sólido utilizando *Serratia marcescens*”

Comité Evaluador:

Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado
Director

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu
Codirector

Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio
Comité Tutorial

Dr. Edgar Allan Blanco Gamez
Comité Tutorial

Dr. Gustavo Raúl Reyna Martínez
Comité Tutorial

Dr. Javier Rivera De la Rosa
Subdirector de Estudios de Posgrado

Dedicatoria

A mis padres, Francisco Aranda y Gloria Valdés, por siempre apoyarme y a mi tía Margarita Valdés, gran investigadora que me ha inspirado a seguir en este camino, descanse en paz.

Agradecimientos

Agradezco a las instituciones que me permitieron llevar a cabo este proceso, primeramente, a la SECIHTI por la beca otorgada durante estos dos años de maestría, gracias a la cual he podido sustentarme. A la Universidad Autónoma de Nuevo León, particularmente a la Facultad de Ciencias Químicas por permitirme realizar mi posgrado y brindarme las herramientas, material e instalaciones para lograrlo. De la misma forma, agradezco al Instituto de Biotecnología de la UNAM por permitirme realizar una estancia de investigación y brindarme su infraestructura, servicios y conocimiento para completar los objetivos de mi investigación.

Agradezco la mentoría y acompañamiento de mis asesores, mi asesora la Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado y mi co-asesor el Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu, así como a mi asesora durante mi estancia la Dra. Clarita Olvera Carranza. Agradezco también a mi comité tutorial por sus consejos, conocimiento y apoyo para trabajar en los laboratorios de Biotecnología y Biología Molecular del CELAES; la Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio y los doctores Edgar Allan Blanco Gamez y Gustavo Raúl Reyna Martínez.

Menciono también a todos mis compañeros de clase, generación y de laboratorio, gracias por su compañía, apoyo y risas. Gracias también a los integrantes del grupo de investigación de Polímeros Biocompatibles del IBT por recibirme e integrarme inmediatamente. Gracias por su amistad.

Gracias a mis papás, Francisco y Gloria, a mi hermano Jesús y a mi familia en general por estar siempre para mí y apoyarme en todo; y muchas gracias a mi mejor amiga, Estefanía, por acompañarme siempre pese a la distancia.

Resumen

Francisco Javier Aranda Valdés

Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Universidad Autónoma de Nuevo León, Marzo de 2026

Directora de Tesis: Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado

Codirector de Tesis: Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu

Este estudio evaluó la producción de esterases extracelulares por la cepa *Serratia marcescens* 11E mediante fermentación en estado sólido (SSF). La identidad de la cepa fue confirmada fenotípicamente y mediante la prueba API20E (ID 5001641). Utilizando un diseño experimental Plackett-Burman, se identificó que una mezcla de cera vegetal y suero de leche (proporción 80:20) optimizó la producción enzimática (0.018 U/mL), actuando como una fuente complementaria de ácidos grasos de cadena larga y azúcares asimilables. El extracto crudo obtenido tras 48 h de fermentación mostró una mayor afinidad por el sustrato 4-nitrofenil acetato (0.743 U/mg) en comparación con el 4-nitrofenil octanoato (0.125 U/mg), lo que clasifica la actividad predominante como esterasa. La caracterización bioquímica reveló un condiciones óptimas de actividad a pH 9.5 y 40 °C, con un pico secundario a pH 7.5, sugiriendo la presencia de isoformas. El análisis mediante SDS-PAGE reveló bandas de aproximadamente 35 a 40 kDa. Finalmente, el fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-200) permitió separar dos picos con actividades específicas de 17 y 26 U/mg. Los resultados confirman la viabilidad de utilizar residuos industriales lipídicos para la obtención biotecnológica de esterases con potencial estabilidad térmica.



Tabla de Contenido

Dedicatoria.....	4
Agradecimientos.....	5
Resumen.....	6
Tabla de Contenido	7
Lista de Tablas.....	9
Lista de Figuras	11
1. Introducción	12
2. Marco Teórico.....	15
2.1 Impacto Global de la Generación y Gestión de Residuos	15
2.2 Revalorización de Residuos	16
2.3 Residuos Ricos en Lípidos	17
2.4 Esterasas y Lipasas: Enzimas Degradadoras de Lípidos	18
2.5 <i>Serratia marcescens</i> : un organismo adaptable.....	19
3. Antecedentes	20
3.1 Producción de Esterasas	20
3.2 Producción de Lipasas	21
4. Justificación.....	24
5. Hipótesis y Objetivos.....	24
5.1 Hipótesis.....	24
5.2 Objetivos	24
5.2.1 Objetivo general	24
5.2.2 Objetivos específicos	25
6. Metodología.....	25

6.1 Material Biológico	25
6.2 Reactivación de la Cepa de <i>Serratia marcescens</i> 11E	25
6.3 Prueba cualitativa de producción de biofilms por <i>Serratia marcescens</i> 11E.....	26
6.4 Prueba cualitativa de actividad enzimática	26
6.5 Obtención de sustratos y condiciones de la fermentación en estado sólido para la producción de enzimas	27
6.6 Prueba cuantitativa de actividad enzimática del extracto crudo	28
6.7 Cuantificación de Proteínas Totales	30
6.8 Caracterización del extracto crudo de lipasa: impacto de la temperatura, el pH y la afinidad por el sustrato en la actividad enzimática	31
6.9 Purificación por cromatografía de filtración en gel y determinación del peso molecular	32
7. Resultados y Discusión	32
7.1 Reactivación e Identificación de la Cepa de <i>Serratia marcescens</i> 11E	32
.....	35
7.4 Condiciones de la fermentación en estado sólido para la producción de enzimas ..	37
.....	Error! Bookmark not defined.
7.5 Caracterización de Sustratos	38
7.7 Caracterización del extracto crudo: impacto de la temperatura, el pH y la afinidad por el sustrato en la actividad enzimática	42
7.8 Determinación del peso molecular	45
8. Conclusiones	49
9. Perspectivas	51
10. Bibliografía.....	52

Lista de Figuras

Figura 1. Generación per cápita de residuos sólidos municipales anuales a nivel global (kg/per cápita/día). Extraído de (<i>What a Waste 2.0</i> , 2018).....	15
Figura 2. Diagrama de la reacción catalítica general de una esterasa/lipasa. Adaptada de (Le et al., 2020).....	18
.....	30
Figura 3. Curva de calibración de albúmina sérica bovina en celda.	30
Figura 4. Curva de calibración de albúmina sérica bovina en microplaca.	31
Fig. 5. Aspecto de <i>Serratia marcescens</i> 11E inoculada en caldo LB (izquierda), en agar LB (centro) después de 24 h de incubación a 30°C y tinción de Gram (derecha).....	33
Figura 6. Identificación positivo de la muestra como <i>Serratia marcescens</i> , mostrando un número de identificación ID 5001641.....	33
Figura 7. Prueba cualitativa de producción de biofilms en la cepa <i>Serratia marcescens</i> 11E en agar rojo Congo.	35
Figura 8. Placa de control con agar tributirina suplementado con Tween 80 (izquierda) y placa inoculada con <i>Serratia marcescens</i> incubada a 30 °C durante 48 horas, mostrando halos de degradación (derecha).	36
Figura 9. Actividad del extracto crudo ante los sustratos 4NPA (p-nitrofenil acetato, 2C), 4 NPB (p-nitrofenil butirato, 4C) y 4 NPO (p-nitrofenil octanoato, 8C); n=3.	40
Figura 10. Actividad relativa (%) del extracto concentrado (lote único, 1.82 mg/mL pts.) en pH 5-10. Sustrato: 4NPA (p-nitrofenil acetato). Condiciones de reacción: 5 min, buffer 50 mM, 50°C, 0.2 U extracto; n=3.	43
Figura 11. Actividad relativa (%) del extracto concentrado (lote único, 1.82 mg/mL pts.) en Temperaturas de 30-50°C. Sustrato: 4NPA (p-nitrofenil acetato). Condiciones de reacción: 5 min, buffer Tris-HCl 50 mM pH 9.5, 0.2 U extracto; n=3.....	43

Figura 12. Cinética enzimática a 30 minutos con pNPA (p-nitrofenil acetato) en rango de concentración 0.1-0.5 mM, n=3. Condiciones de reacción: 30 min, medición continua (1 min), pH 9.5 50 mM, 40°C, sustrato 0.1-0.5 mM, 0.2 U extracto.44

Figura 13. Gel de electroforesis: El carril 1 contiene el marcador de peso molecular, el carril 2 una lipasa de referencia proveniente de *Pseudomonas fluorescens* y el carril 3 contiene el extracto enzimático.46

Figura 14. Fracciones obtenidas en la etapa cromatográfica con la resina Sephadex G-100.47

Figura 15. Actividad relativa (%) de las fracciones concentraciones y de sus filtrados ante diversos sustratos: 4NPA (p-nitrofenil acetato, 2C); 4 NPB (p-nitrofenil butirato, 4C); 4 NPO (p-nitrofenil octanoato, 8C). Condiciones de reacción: 5 min, punto final, pH 8.5, 50°C, sustrato 5 mM.48

Lista de Tablas

Tabla 1. Aplicaciones industriales de las esterasas (Akram et al., 2025; Cabrera & Blamey, 2018; Rafeeq et al., 2022).	18
Tabla 2. Aplicaciones industriales de las lipasas (Chandra et al., 2020; Guerrand, 2017).	19
Tabla 3. Producción de esterasas por medio de fermentación sólida y sumergida empleando diversos microorganismos.	21
Tabla 4. Producción de lipasas por medio de fermentación sólida y sumergida empleando diversos microorganismos.	23
Tabla 5. Composición del agar rojo Congo.	26
Tabla 6. Composición del agar Tween 80	26
Tabla 7. Factores considerados en los diseños experimentales.	27
Tabla 8. Condiciones y factores del diseño experimental.	28
Tabla 9. Resultados de prueba API20E mostrando el porcentaje de reacciones positivas reportadas para <i>Serratia marcescens</i> (bioMérieux, 2010).	34
Tabla 10. Factores relevantes y actividad volumétrica (U/mL) de las corridas del diseño experimental.	37
Tabla 11. Perfil fisicoquímico de muestra de suero de leche.	38
Tabla 12. Perfil de ácidos grasos de la cera vegetal.	39
Tabla 13. Actividad total (U), volumétrica (U/mL) y específica (U/mg) del extracto enzimático para pNPA (p-nitrofenil acetato) en un rango de concentración de sustrato 0.1-0.5 mM; n=3.	44
Tabla 14. Tabla de rendimiento de purificación del extracto crudo y las fracciones obtenidas con la mayor actividad. Sustrato: 4-NPA (4-nitrofenil acetato).	47

1. Introducción

El crecimiento de la población mundial ha generado diversos desafíos, como el aumento en la demanda de productos, bienes y servicios, incluyendo alimentos y agua. Sin embargo, esta mayor actividad industrial para cubrir esas necesidades también incrementa la generación de residuos, que, si no se gestionan adecuadamente, pueden tener graves repercusiones para el ecosistema y sus especies, incluido el ser humano. Se calcula que entre 400,000 y 1 millón de personas fallecen cada año por enfermedades relacionadas con un mal manejo de residuos (Environment, 2024).

En este contexto, el uso de residuos generados en diversos procesos agrícolas e industriales se ha vuelto especialmente relevante en las últimas décadas, dado que se calcula que el 68% de los residuos municipales en todo el mundo se desaprovecha (Environment, 2024). Por ello, la reutilización de residuos surge como una estrategia clave en la economía circular, ya que permite crear productos de valor agregado con poca inversión en su procesamiento, cuando de otra manera serían desechados (Oiza et al., 2022). Esto resulta particularmente interesante en comparación con otros métodos de tratamiento, cuyo objetivo principal es reducir los costos de disposición del desecho (Yafetto, 2022). Desde un punto de vista de economía sustentable, los residuos también representan una fuente de materias primas, en un contexto donde el acceso a recursos naturales se vuelve cada vez más difícil (López-Gómez et al., 2020). En particular, los residuos de la industria alimentaria son muy atractivos para procesos fermentativos, pues son ricos en macro y micronutrientes, lo que facilita su uso como sustratos para la producción de moléculas o sustancias de interés comercial mediante microorganismos (López-Gómez et al., 2020).

Particularmente, los residuos ricos en lípidos, como el aceite de cocina gastado (WCO), el bagazo residual de la producción de aceite vegetal, residuos de la industria láctea y alimentaria, granos de café gastados, entre otros, son desechos dañinos para el medio ambiente si no se gestionan adecuadamente, especialmente para ecosistemas acuáticos (Foo et al., 2021). Por ejemplo, estos residuos con alto contenido lipídico tienden a crear películas en la superficie del agua, reduciendo el intercambio de gases y, en consecuencia, la oxigenación del medio, lo que afecta los procesos respiratorios de las especies que lo habitan (Moya-Salazar et al., 2020). En este contexto, el aprovechamiento de estos residuos, además de aliviar estos problemas ambientales, puede utilizarse en la producción de diversos compuestos de interés industrial, como pigmentos,

esencias, biosurfactantes, biocombustibles, bioplásticos y enzimas, siendo estas últimas particularmente atractivas comercialmente por su gran versatilidad en aplicaciones (Cheng et al., 2021; Mou et al., 2024; Sánchez, Oiza, Artola, Font Segura, et al., 2024).

Las enzimas lipasas, también llamadas triacilglicerol acil hidrolasas, son muy populares debido a su bajo costo de producción y su capacidad para catalizar varias reacciones como hidrólisis, esterificación, transesterificación, aminólisis y amidación (Ali et al., 2023). Por lo general, las lipasas son bastante estables en una amplia variedad de temperaturas, pH y en presencia de iones (Godoy et al., 2022).

Las esterasas por su parte son enzimas que han incrementado en popularidad en procesos industriales debido a su potencial como biocatalizadores versátiles, ya que son capaces de hidrolizar enlaces éster en una gran variedad de sustratos, desde ésteres de cadena corta hasta ésteres poliméricos complejos, esto debido a su diversidad como grupo enzimático, exhibiendo una gran plasticidad y complejidad estructural (Mussakhmetov & Silayev, 2025).

La producción de estas enzimas ha sido reportada por una amplia variedad de microorganismos, principalmente bacterias y hongos, tales como *Micrococcus roseus*, *Saitozyma flava*, *Serratia marcescens* y diversas especies de pseudomonas como lo son *Otitidis* y *Aeruginosa* (Gupta et al., 2013; Long et al., 2007); típicamente bajo condiciones de fermentación sumergida. La fermentación sumergida (SmF) es un proceso en el cual el medio de crecimiento es líquido, en donde se disuelven los nutrientes y generalmente requiere de agitación y aireación constante para mantener el medio oxigenado; es usado comúnmente en la industria debido a su escalabilidad, siendo más sencillo de controlar en volúmenes industriales (Szymczak et al., 2021). Por el contrario, en la fermentación en estado sólido (SSF) el crecimiento ocurre en un medio sólido, con ausencia casi total de agua libre (Hölker et al., 2004; Londoño Hernandez et al., 2020); más no necesariamente baja humedad. Este tipo de fermentación ha generado interés en las últimas décadas ya que de forma general presenta mejores rendimientos en la producción de metabolitos, menor complejidad operativa y requerimientos energéticos relativamente bajos (en términos de agitación), así como menor uso de agua (Londoño Hernandez et al., 2020; Pandey, 1992; Rodriguez-Couto & Sanromán, 2006). Aunado a esto, las condiciones de crecimiento son similares al hábitat natural de la mayoría de los microorganismos utilizados (López-Gómez et al., 2020; Ptaszek et al., 2023).

La reducción de requerimientos energéticos y, por lo tanto, de costos materiales es un factor que hace de la SSF atractiva frente a la fermentación sumergida. Por ejemplo, Castilho y colaboradores reportaron la producción de lipasas usando *Penicillium restrictum* tanto en medios sólidos como sumergidos; en el estudio establecieron que, considerando una estimación de los gastos de una producción anual para ambos métodos, la fermentación sumergida implicaba un incremento del 78% en comparación de la sólida, siendo el bajo costo del sustrato sólido un factor relevante (Castilho et al., 2000).

La producción de estas enzimas se ha registrado usando diferentes bacterias y hongos, destacando especies como *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus roseus*, *Serratia marcescens* y *Saitozyma flava* (Gupta et al., 2013; Long et al., 2007). Por tanto, es interesante estudiar la producción de estas enzimas microbianas, de alto valor comercial, a partir de residuos industriales normalmente desechados. La producción de enzimas para uso industrial a partir de residuos o materiales residuales representa una opción sustentable que puede hacer más eficientes los procesos en las cadenas de producción. Por eso, este proyecto propone usar la bacteria *Serratia marcescens* para producir enzimas (lipasas y esterases) mediante fermentación en estado sólido (SSF por sus siglas en inglés), ya que se ha observado actividad lipolítica previa en cultivos de esta bacteria.

2. Marco Teórico

2.1 Impacto Global de la Generación y Gestión de Residuos

El crecimiento acelerado de la población mundial en las últimas décadas ha creado diversos desafíos relacionados con las actividades humanas, principalmente en la demanda de bienes, alimentos, agua, servicios y energía. Esto ha impulsado un aumento en la actividad industrial a nivel mundial, lo que en general eleva la cantidad de residuos generados (ver Figura 1). El efecto de estos residuos en el medio ambiente y la salud humana está estrechamente ligado a cómo se manejan, procesan y disponen. Cuando no se tratan, aíslan o eliminan adecuadamente, pueden provocar daños graves en los ecosistemas, biodiversidad y en la salud de las comunidades humanas que interactúan con ellos.

A escala global, se estima que la generación de residuos sólidos municipales supera los 2,000 millones de toneladas anuales, y de seguir esta tendencia, esta cifra podría ascender a los 3,800 millones de toneladas para el año 2050, lo que equivale a un aumento del 73% (*What a Waste 2.0*, 2018). Aunado a esto, se estima que entre el 20-30% de los residuos generados a nivel global son gestionados de manera inadecuada, como lo puede ser la quema al aire libre, el vertido en espacios abiertos o la disposición de residuos no tratados.

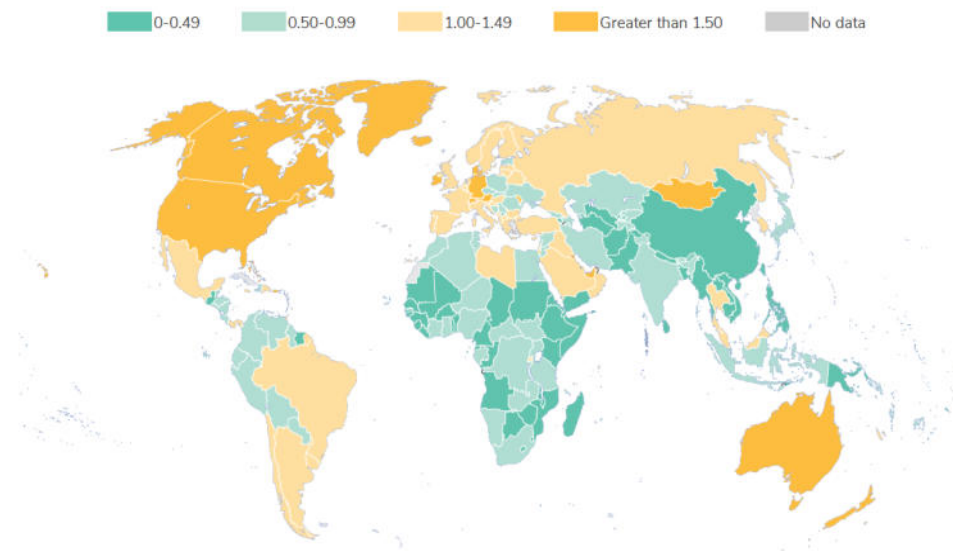


Figura 1. Generación per cápita de residuos sólidos municipales anuales a nivel global (kg/per cápita/día). Extraído de (*What a Waste 2.0*, 2018).

En cuanto a consecuencias para la salud humana, la sanidad pública es uno de los elementos más afectados, vinculado principalmente a factores como la contaminación de agua y suelo, la proliferación de vectores de infección (insectos, roedores), la emisión de compuestos tóxicos volátiles y el bloqueo de sistemas de drenaje y/o contaminación de sistemas de transporte de agua y cuerpos de agua naturales. La Organización Mundial de la Salud estima que el deterioro de los sistemas de saneamiento, sanidad pública y de tratamiento de aguas residuales, los cuales son afectados directamente por la mala gestión de residuos, está asociado a alrededor de 1.4 millones de muertes anualmente (*Estimating WASH-Related Burden of Disease*, s/f).

2.2 Revalorización de Residuos

Considerando la problemática previamente mencionada, el uso de residuos de procesos industriales y agrícolas adquiere gran importancia. Su revalorización en procesos productivos no solo reduce el volumen total de residuos en el ecosistema, sino que también actúa como un tratamiento parcial o total, disminuyendo el impacto ambiental negativo. A nivel mundial, se estima que el 68% de los residuos municipales generados se desaprovechan (Environment, 2024). Por ello, la reutilización de residuos es una estrategia clave en economía circular, ya que materia que de otra forma sería descartada puede aprovecharse para la generación de productos de valor agregado (Oiza et al., 2022). Esta estrategia de gestión contrasta con otros métodos que solo buscan reducir costos de disposición, y desde una perspectiva de economía sustentable, convierte los residuos en un recurso para obtener valor y aprovechar materia en un contexto de demanda creciente y escasez de recursos naturales (López-Gómez et al., 2020), una situación cada vez más compleja.

Específicamente, los residuos provenientes de la industria alimentaria y agrícola son especialmente atractivos para procesos microbiológicos, ya que son ricos en nutrientes necesarios para el crecimiento y la propagación de cultivos microbianos; el aprovechamiento de este tipo de procesos para la producción de biomasa o moléculas de interés comercial o industrial abre la posibilidad de revalorizar estos residuos bajo esquemas de relativamente bajo costo, bajo consumo energético y con el potencial de la degradación parcial de estos residuos previa a su disposición final.

2.3 Residuos Ricos en Lípidos

Los residuos ricos en lípidos constituyen un grupo diverso dentro de los residuos industriales y agrícolas, incluyendo aceites gastados (WCO por sus siglas en inglés), bagazo residual, ceras provenientes de la producción y clarificación de aceite vegetal, residuos de la industria láctea, entre otros. Estos residuos representan un reto importante de gestión, ya que, si no son tratados o eliminados adecuadamente, pueden causar impactos negativos en el ecosistema, especialmente en suelos y cuerpos de agua (Foo et al., 2021). Los lípidos de estos residuos suelen formar películas en la superficie de cuerpos de agua, dificultando el intercambio de gases, lo que reduce la oxigenación del medio y puede afectar negativamente a las especies acuáticas, favoreciendo el desarrollo de zonas de anoxia o hipoxia (Moya-Salazar et al., 2020).

Además, las aguas y efluentes con altos niveles de grasas y aceites (FOG, por sus siglas en inglés - Fats, oils and grease) pueden afectar los sistemas de tratamiento de aguas, causando turbulencias, acumulación de ácidos grasos de cadena larga que inhiben los procesos biológicos, y promoviendo la formación de gases, olores desagradables y lodos difíciles de gestionar (Cirne et al., 2007).

La problemática de estos residuos también presenta una oportunidad para su aprovechamiento y revalorización. Al considerarse como materia prima, pueden emplearse como sustratos en procesos microbiológicos, como la producción de enzimas lipasas y esterases mediante fermentación en estado sólido (SSF) (Fibriana et al., 2021). Por su alto contenido en lípidos y otros componentes orgánicos, estos residuos son una fuente de carbono fácilmente disponible que también estimula la producción de enzimas lipolíticas. Además, como subproductos de diversos procesos, sirven como un sustrato económico para cultivos microbianos.

Como estrategia general, aprovechar residuos ricos en lípidos favorece la economía circular y la gestión sostenible de residuos, ya que convierte un problema ambiental y una fuente importante de contaminación en una oportunidad para generar valor agregado. Esto puede traducirse en la producción de una amplia variedad de materiales y sustancias de interés comercial e industrial. En este sentido, los procesos de revalorización de SSF con residuos ricos en lípidos permiten, de manera simultánea, reducir el impacto ambiental al evitar su disposición inadecuada y producir productos útiles para la industria biotecnológica.

2.4 Esterasas y Lipasas: Enzimas Degradadoras de Lípidos

Las enzimas esterases hidrolizan enlaces ésteres y tienen una afinidad especial por lípidos y ésteres de cadena corta o altamente soluble en agua; en cambio, las lipasas prefieren lípidos insolubles o de cadena larga (Ver Figura 2).



Figura 2. Diagrama de la reacción catalítica general de una esterasa/lipasa. Adaptada de (Le et al., 2020).

Las esterases poseen un gran potencial biotecnológico, ya que son capaces de hidrolizar moléculas pequeñas y solubles que tienen poca afinidad por las lipasas. Además, pueden producirse de manera eficiente a partir de sustratos agroindustriales mediante procesos fermentativos (Bulgari et al., 2023; Mattedi et al., 2023), para su uso en diversas industrias, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Aplicaciones industriales de las esterases (Akram et al., 2025; Cabrera & Blamey, 2018; Rafeeq et al., 2022).

Esterasas	
Industria	Aplicación
Alimentos y bebidas	Maduración de quesos, hidrólisis de ésteres lácteos, modificación de perfil de sabor en fermentados y síntesis de ésteres volátiles (sabor y aroma).
Farmacéutica	Resolución de mezclas racémicas, síntesis de ésteres.
Biorremediación	Degradación de ésteres contaminantes, procesos de revalorización.
Bioplásticos	Reciclaje enzimático (hidrólisis de poliésteres).

Las lipasas (o triacilglicerol acil hidrolasas) son un tipo de esterases muy usadas comercialmente (Ver Tabla 2), debido a su bajo costo de producción y su habilidad para catalizar procesos como hidrólisis, esterificación, transesterificación, aminólisis y amidación (Ali et al.,

2023). En general, las lipasas y otras esterasas tienen buena estabilidad en una amplia variedad de temperaturas y pH, además de conservar su actividad en presencia de iones.

Tabla 2. Aplicaciones industriales de las lipasas (Chandra et al., 2020; Guerrand, 2017).

Lipasas	
Industria	Aplicación
Alimentos y bebidas	Maduración de quesos, modificación de grasas comestibles, condicionamiento de masas.
Biocombustibles	Transesterificación de aceites vegetales y grasas residuales.
Detergentes	Como aditivo para la remoción de manchas grasas.
Textiles y papel	Desengrasado de pieles y tratamiento de control de “pitch” en la producción de papel.
Cosmética y farmacéutica	Producción de ésteres volátiles (aromas) y síntesis de intermediarios quirales.

2.5 *Serratia marcescens*: un organismo adaptable

La bacteria *Serratia marcescens*, del filo *Pseudomonata* y de la familia *Enterobacteriaceae*, es una especie quimio heterótrofa, mesófila y anaeróbica facultativa con bajos requerimientos nutricionales. Esto la hace altamente adaptable, pudiendo sobrevivir en diversos hábitats como suelos, aguas y superficies de plantas. También puede colonizar tractos respiratorios animales y se ha encontrado en humanos en entornos hospitalarios. Es un bacilo Gram negativo (con características Gram variables) que mide aproximadamente 0.9-2 μm de largo y 0.5-0.8 μm de diámetro (Canada, 2012). Su capacidad de adaptación y supervivencia en diferentes condiciones indican un amplio repertorio enzimático, con capacidad para aprovechar diversas fuentes de carbono, incluidos los lípidos. En el género *Serratia*, se ha reportado la producción de esterasas. Por ejemplo, Bhardwaj et al. (2021) describe una especie de *Serratia* que produce una esterasa termo tolerante con una actividad específica de 1.19 U/mg en extracto crudo, la cual aumenta a 29.11 U/mg tras purificación en tres pasos, con condiciones óptimas a pH 8.5 y 50°C. En *Serratia marcescens*, la producción reportada proviene principalmente de estudios en fermentación líquida, alcanzando actividades de 13.3 U/gds (Unidades de actividad por gramo de sustrato sólido) con

tributirina y 11.94 U/gds usando aceite de oliva como inductor (Gupta et al., 2013; Long et al., 2007).

3. Antecedentes

3.1 Producción de Esterasas

Las esterasas son un grupo importante de hidrolasas que actúan principalmente sobre enlaces éster, especialmente en moléculas de cadena corta y soluble en agua. Son muy similares a las lipasas, que también son esterasas, con una triada catalítica Ser-Asp/Glu-His. Sin embargo, las esterasas muestran mayor actividad en sustratos más hidrosolubles y no requieren una interfaz lípido-agua para funcionar. Gracias a su versatilidad, estas enzimas son fundamentales en procesos biocatalíticos industriales, como la síntesis química, el procesamiento de residuos y la producción de biopolímeros. También participan en la conversión de derivados de biomasa vegetal en diversas industrias, incluyendo la alimentaria, cosmética y farmacéutica.

Respecto a su producción mediante procesos fermentativos, en hongos filamentosos esta se ha registrado en SSF, con actividades de 0.264 U/mg en *Trichoderma asperellum* utilizando digestato agrícola como sustrato (Bulgari et al., 2023). Esto sugiere que sustratos económicos, como residuos lignocelulósicos y agroindustriales, son idóneos para la producción de enzimas extracelulares.

En las bacterias, hay una gran variedad de esterasas. Por ejemplo, organismos como *Lactobacillus acidophilus* y *L. johnsonii* producen esterasas que actúan contra ésteres simples, compuestos aromáticos y otras moléculas vegetales, útiles en productos fermentados, en la producción de aromas alimentarios y en la degradación parcial de fibra dietética (Andrada et al., 2022; Jeon et al., 2023). Otro ejemplo son las esterasas del género *Streptomyces*, que tienen enzimas activas frente a ésteres alifáticos y derivados de carbohidratos, lo que las hace interesantes como biocatalizadores en procesos de revalorización de productos agrícolas (Uraji et al., 2014). La Tabla 3 presenta un condensado de las condiciones de producción de las enzimas esterasas en fermentación sólida y en fermentación sumergida, empleando diversos microorganismos.

Tabla 3. Producción de esterases por medio de fermentación sólida y sumergida empleando diversos microorganismos.

Producción de esterases								
Microorganismo	Fermentación	Sustratos	(°C)	pH	Humedad (%)	Tiempo (h)	Rendimiento (U/mg)	Referencia
<i>Serratia</i> sp.	LSF	Aceite de semilla de algodón	40°C	-	-	48 h	Extracto crudo: 1.19 U/mg Post-purificación: 29.11 U/mg	(Bhardwaj et al., 2021)
<i>Bacillus altitudinis</i> AP-MSU	SSF	Residuos de mero rojo	50°C	8	80%	72 h	3.320 U/g	(Esakkiraj et al., 2012)
<i>Natronococcus</i> sp. TC6	SSF	Medio DSM97 en soportes inertes de poliuretano y fibra de vidrio.	40°C	8	$a_w: 0.74 \pm 0.1-0.78 \pm 0.1$	120 h	0.388 U/mL	(Martin del Campo et al., 2015)
<i>Aspergillus niger</i>	SSF	Salvado de trigo y maíz	36 °C	-	50%	72 h	7.68 mU/g	(Ou et al. 2011)
<i>Trichoderma asperellum</i>	SSF	Digestato agrícola, residuos frutales, aserrín	30°C	-	-	144 h	0.264 U/mg	(Bulgari et al. 2023)

3.2 Producción de Lipasas

Las lipasas son enzimas de la familia de las α/β hidrolasas que catalizan la hidrólisis de enlaces éster mediante una triada conformada por serina, histidina y un residuo ácido, generalmente ácido aspártico (Pirahanchi y Sharma 2024). Estas enzimas tienen preferencia por moléculas de cadena larga, poco solubles en agua. Son relevantes en la industria para modificar lípidos comestibles, masas, jugos, lácteos, productos cárnicos, nutracéuticos (Godoy et al. 2022) y en sectores como cosmética, detergentes, textiles, papel, biorremediación y producción de biodiesel (Ali et al. 2023; Chandra et al. 2020; Guerrand 2017). Diversos microorganismos como

Micrococcus roseus, *Saitozyma flava*, *Serratia marcescens* y varias especies de *Pseudomonas* han sido reportados como productores de lipasas, generalmente mediante fermentación sumergida (LSF) por su control y escalabilidad (Gupta et al. 2013; Long et al. 2007; Szymczak et al. 2021). La fermentación en estado sólido (SSF), con poca agua libre (Hölker et al. 2004), ha ganado importancia por su menor consumo energético y de agua, además de aprovechar sustratos de bajo costo, reproduce las condiciones naturales de crecimiento de microorganismos (Pandey 1992; Rodríguez-Couto y Sanromán 2006; López-Gómez et al. 2020). Presenta costos hasta un 78% menores comparados con la fermentación sumergida (Castilho et al. 2000). La SSF ha logrado niveles de producción aceptables usando residuos agroindustriales como sustrato reportando 826 U/gds empleando *Rhizopus homotallicus* con bagazo de caña (Rodríguez et al. 2006), 6.66 U/gds en *Micrococcus roseus* a bajas temperaturas (Joseph et al. 2011) y hasta 107.44 U/gds en *Pseudomonas sp.* BUP6 con bagazos oleosos (Faisal et al. 2014). También se han obtenido buenos resultados en procesos no estériles y con consorcios microbianos (Santis-Navarro et al. 2011; Sahoo et al. 2014). La Tabla 4 presenta un condensado de las condiciones de producción de las enzimas lipasas en fermentación sólida y en fermentación sumergida, empleando diversos microorganismos.

Tabla 4. Producción de lipasas por medio de fermentación sólida y sumergida empleando diversos microorganismos.

Producción de lipasas								
Microorganismo	Fermentación	Sustratos	T (°C)	pH	Humedad (%)	Tiempo (h)	Rendimiento (U/gds ⁴)	Referencia
<i>Pseudomonas sp.</i> BUP6	SSF ¹	Mezcla basal de sales (MS) y bagazo de aceite de cacahuete	8°C	9	33	48 h	LP (Producción de lipasa): 107.44 U/gds (pre-optimización) 180.75 U/gds (post-optimización)	(Faisal et al. 2014)
<i>Pseudomonas sp.</i> S1	SSF no estéril	Bagazo de aceite de oliva	7°C	7	-	96 h	LP: 57.9 U/g-1 La enzima fue estable a 50°C por 360 min	(Sahoo et al. 2014)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SmSF ²	Bagazo de aceite de <i>Azadirachta indica</i> , coco y mostaza	7°C	8	-	96 h	LP: 17.236 U/gds NH4NO3: 79% incremento en actividad de la lipasa Bagazo de aceite de coco (COC): 38% de incremento en producción de lipasa Bagazo de aceite de mostaza (MOC): 25.95% de incremento en producción de lipasa	(Sachan y Singh 2017)
<i>Pseudomonas otitidis</i>	SSF	Aceite de girasol gastado	5°C	7.5	-	75 h	LP: 1980 U/mL	(Fibriana et al. 2021)
<i>Micrococcus roseus</i>	SmSF	Bagazo de aceite de cacahuete y mostaza	5 ± 1°C	8	-	48 h	LP: 1.66-6.66 U/gds	(Joseph et al. 2011)
<i>Serratia marcescens</i>	LSF ³	Medio basal de sales	0°C	7	-	24 h	640 U/g-1 masa celular	(Long et al. 2007)
	LSF	Medio basal	0°C	7	-	48 h	Tributirina: 13.3 U/gds Aceite de oliva: 11.94 U/gds	(Gupta et al. 2013)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	SSF	Bagazo de aceite de Andiroba y sólidos de soya	2-34°C	5.3-7.63	53-58	24 h	LP: 82.52 U/gds	(Carvalho et al. 2023)
<i>Rhizopus homothallicus</i>	SSF	Bagazo de caña de azúcar	0°C	5-6	75	12 h	Oligoelementos: 27% de incremento en producción de lipasa LP: 826 U/gds	(Rodriguez et al. 2006)
<i>Aspergillus foetidus</i>	SSF	Granos de café molidos	7°C	-	50	144 h	LP: 2941.87 U/ml	(da Silva França et al. 2022)
<i>Saitozyma flava</i>	LSF	Melaza y aceite de cocina gastado	8°C	8	-	48 h	LP: 150 U/gds	(Donzella et al. 2024)
<i>Penicillium roqueforti</i>	SSF	Fibra de cacao	7°C	-	70	72 h	Con aceite de palma: 33.33±3.33 U/gds Sin aceite de palma: 14.67 U/gds	(Araujo et al. 2022)

1. **SSF:** Fermentación en estado sólido (Solid State Fermentation)
2. **SmSF:** Fermentación en estado semi sólido (Semi Solid State Fermentation)
3. **LSF:** Fermentación en estado líquido o sumergida (Liquid State Fermentation)
4. **U/gds:** Unidad enzimática por gramo de sustrato sólido seco inicial (Enzyme unit per gram of initial dry solid substrate)

4. Justificación

Este trabajo aporta información de relevancia sobre una esterasa nativa de la especie *Serratia marcescens*, bacteria para la cual, y para su género en general existe información limitada respecto a las características bioquímicas y cinéticas de este tipo de enzimas, así como de condiciones de producción en sistemas de fermentación tanto sólidos como sumergidos. Esta falta de información es más notoria en estudios relacionados con el uso de residuos orgánicos como sustrato/soporte del proceso fermentativo.

En este contexto, la investigación presente genera conocimiento sobre la producción de enzimas mediante fermentación en estado sólido utilizando residuos derivados de la industria alimentaria, como lo son la cera vegetal (derivado del proceso de winterización de aceites vegetales), y el suero de leche de la industria láctea. Así mismo, se obtiene información sobre la actividad, afinidad por sustrato y características bioquímicas de un extracto enzimático con actividad de naturaleza esterásica.

5. Hipótesis y Objetivos

5.1 Hipótesis

Serratia marcescens 11E será capaz de producir lipasas/esterasas extracelulares con una actividad superior a 13.3 U/gds mediante un proceso de fermentación en estado sólido empleando como sustrato residuos ricos en lípidos provenientes de la industria alimentaria.

5.2 Objetivos

5.2.1 Objetivo general

Producir enzimas lipasas/esterasas empleando la bacteria *Serratia marcescens* 11E bajo condiciones de fermentación en estado sólido usando como sustrato residuos ricos en lípidos de la industria alimentaria.

5.2.2 Objetivos específicos

1. Realizar un tamizaje con *Serratia marcescens* a través de un diseño de experimentos exploratorio que permita determinar el efecto de los sustratos a emplear en la producción de lipasas/esterasas.
2. Realizar la extracción y semi-purificación de las lipasas/esterasas bajo el modelo de fermentación más eficiente del diseño de experimentos.
3. Caracterizar las enzimas en función de afinidad y actividad ante diferentes temperaturas y pH.

6. Metodología

6.1 Material Biológico

Durante este proyecto de investigación se utilizó la cepa de *Serratia marcescens* 11E, resguardada en el Laboratorio de Innovación y Desarrollo Biotecnológico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.2 Reactivación de la Cepa de *Serratia marcescens* 11E

A partir de un vial glicerado de la cepa de *Serratia marcescens* 11E, almacenado a -10°C, del cual se inocularon 500 µL en 40 mL de caldo LB-Miller y se incubó a 30°C con agitación durante 24 horas. Luego, se sembró en agar LB-Miller por estría para su conservación temporal, incubándose a 30°C por 24 horas. Después, se selló con parafilm y se guardó a 4°C en refrigeración por un máximo de 4 semanas. Se limitaron a 5 los pasajes de resiembra, utilizando un nuevo vial glicerado para los experimentos. Para confirmar la identidad de la bacteria, se realizó una prueba API20E y una tinción Gram.

6.3 Prueba cualitativa de producción de biofilms por *Serratia marcescens* 11E

La prueba para detectar biofilms se realizó siguiendo el protocolo de Freeman y colaboradores (1989), usando Agar rojo Congo, cuyos componentes se describen en la Tabla 5, mezclados y esterilizados a 121°C durante 5 minutos en un autoclave automática. Después, se sembró la cepa por estría y se incubó a 37°C durante 24 horas en condiciones aeróbicas. La prueba se considera positiva si se observan colonias negras con textura seca y cristalina, o colonias rosadas con oscurecimiento en el centro, mientras que los resultados negativos corresponden a la ausencia de dichas características.

Tabla 5. Composición del agar rojo Congo.

Composición del Agar Rojo Congo	
Compuesto	g/L
Infusión corazón cerebro	37
Sucrosa	50
Agar bacteriológico	10
Pigmento rojo Congo	0.8

6.4 Prueba cualitativa de actividad enzimática

Se preparó un agar enriquecido con Tween 80 (Tabla 6), que sirvió como la principal fuente de carbono, siendo un éster de sorbitol con un ácido graso de 18 carbonos. Los componentes se mezclaron y se esterilizaron a 121°C durante 5 minutos en una autoclave automática. Luego, la cepa se sembró en el agar mediante estrías y se incubó a 30°C durante 48 horas en condiciones aeróbicas. La prueba resulta positiva debido a la hidrólisis de esta molécula, evidenciada por un halo blanquecino, producto de la precipitación de sales insolubles de ácidos grasos.

Tabla 6. Composición del agar Tween 80

Composición de Agar Tween-80	
Compuestos	g/L

Agar de tributirina	20
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0.1
Tween 80	10 mL/L

6.5 Obtención de sustratos y condiciones de la fermentación en estado sólido para la producción de enzimas

Los sustratos utilizados en este estudio provienen de comercios locales. Los sustratos sólidos incluyen café gastado, residuos de pan y cera vegetal, mientras que los líquidos son aceite quemado de maíz y suero de leche. Para crear condiciones favorables de fermentación y producción de enzimas, se diseñó un experimento exploratorio tipo Plackett-Burman con 7 factores: tipos y proporciones de sustratos, temperatura, pH, tiempo de incubación y cantidad inicial de inóculo (4 numéricos y 3 categóricos). Los valores de estos factores se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Factores considerados en los diseños experimentales.

	Factor	Unidad	Mínimo	Máximo
A	Temperatura	°C	30	37
B	Incubación	Horas	14	72
C	Inóculo	%	0.5	1
D	pH	-	5	11
E	Sustrato sólido	%	Café gastado, residuos de pan, cera vegetal	
F	Sustrato líquido	%	Aceite quemado (maíz), suero de leche	
G	Proporción de sustratos (sólido/líquido)	%	70:30	80:20

El diseño de experimentos se llevó a cabo con el programa Design Expert 13, realizando 15 corridas cuyos detalles se encuentran en la Tabla 8. El análisis estadístico de los resultados se

realizó automáticamente con el mismo software, evaluando la actividad enzimática como factor de respuesta en función de las condiciones de fermentación. Cuando la fermentación termina, el sobrenadante libre de células se recupera mediante centrifugación a 9000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Este sobrenadante, llamado extracto crudo, se concentró mediante ultrafiltración con una membrana de corte de 50 kDa y luego se analizó su actividad enzimática.

Tabla 8. Condiciones y factores del diseño experimental.

Primer diseño experimental							
#	F1: T(°C)	F2: pH	F3: Inoculo (%)	F4: Incubación (h)	F5: Sustrato A	F6: Sustrato B	F7: Proporción
1	28	9	0.5	36	Café gastado	Suero de leche	80:20
2	28	9	1	14	Residuo de pan	Aceite gastado	80:20
3	28	9	1	14	Residuo de pan	Aceite gastado	80:20
4	37	5	0.5	36	Residuo de pan	Suero de leche	70:30
5	28	5	1	14	Café gastado	Suero de leche	70:30
6	37	5	1	14	Cera vegetal	Aceite gastado	70:30
7	37	5	1	36	Cera vegetal	Suero de leche	80:20
8	37	5	0.5	36	Residuo de pan	Suero de leche	70:30
9	28	5	0.5	14	Cera vegetal	Suero de leche	80:20
10	37	9	0.5	14	Cera vegetal	Suero de leche	70:30
11	28	9	1	36	Cera vegetal	Suero de leche	80:20
12	37	9	1	36	Café gastado	Aceite gastado	70:30
13	37	5	0.5	14	Café gastado	Aceite gastado	80:20
14	28	5	0.5	36	Cera vegetal	Aceite gastado	70:30
15	28	5	1	14	Café gastado	Suero de leche	80:20

6.6 Prueba cuantitativa de actividad enzimática del extracto crudo

Determinación de actividad enzimática en celda

La actividad enzimática del extracto crudo se evaluó mediante espectrofotometría con un equipo Cary 50 (Varian Inc., Palo Alto, CA, EE. UU.), registrando los cambios de absorbancia a 405 nm usando como sustrato de 4-nitrofenil acetato (pNPA) a 0.5 mM. La reacción (500 µL) contenía un buffer de fosfatos 0.15 M (pH 7.4), Triton X-100 al 0.5%, 30 µL de extracto enzimático crudo y 20 µL de 4-NPA. La mezcla de reacción se incubó a 30 °C durante 15 minutos en una cubeta de 1 mL. Después del tiempo de incubación, se agrega inmediatamente 500 µl de una solución para detener la reacción (carbonato de sodio 1 M) para alcalinizar la muestra y deprotonar el 4-nitrofenol (Juntachai & Kajiwara, 2015).

Una unidad de actividad enzimática (U) corresponde a la cantidad de enzima que libera 1 µmol de 4-nitrofenol por minuto bajo las condiciones del ensayo. El cálculo de las unidades de actividad se realizó mediante la siguiente ecuación (Sigma-Aldrich 1997):

$$Unidad/ml\ de\ enzima = \frac{(A_{405nm}/min\ Test - A_{405nm}/min\ Blanco)(vt)(fd)}{(18)(0.1)} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

vt = volumen en mL del ensayo.

fd = factor de dilución.

18 = coeficiente de extinción molar (mM) del 4-nitrofenol a 405 nm.

0.1 = volumen en mL de enzima usada.

Determinación de actividad enzimática en microplaca

La actividad enzimática fue determinada mediante espectrofotometría con un lector de microplacas BioTek Epoch2, registrando de forma continua, cambios de absorbancia de la reacción a 405 nm usando como sustrato 4-nitrofenil acetato (pNPA). La reacción (200 µL) contenía 175 µL de buffer de Tris-HCl 50 mM (pH 8.5), 20 µL de extracto enzimático y 5 µL del stock de sustrato con concentración final 0.5 mM. La reacción se monitoreo de forma continua con lecturas cada 60 segundos a temperatura constante (50°C) por al menos 10 minutos. En el caso de reacciones con un pH de trabajo menor a 7.5, se realizó únicamente una lectura de punto final, con un tiempo de incubación de 5 minutos y previo a la lectura, se adicionó un volumen de reacción de Carbonato de Sodio 0.5 M. para alcalinizar la muestra y deprotonar el 4-nitrofenol.

6.7 Cuantificación de Proteínas Totales

Determinación de proteínas totales en celda

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford, utilizando albúmina sérica bovina como estándar (Bradford, 1976). La prueba consiste en agregar 20 µl de extracto crudo a 1000 µl de reactivo de Bradford 1x, homogeneizar con un vortex y dejar reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos, protegida de la luz. Después, se midió la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína total (mg/mL) se calculó mediante una curva de calibración con albúmina sérica bovina en concentraciones de 0 a 1 mg/mL, en incrementos de 0.2 mg/mL (Figura 3). Todas las mediciones se realizaron en triplicado, y se promediaron los resultados. Por su parte, la actividad específica (U/mg) se calculó a partir de la concentración de proteína total (mg/mL).

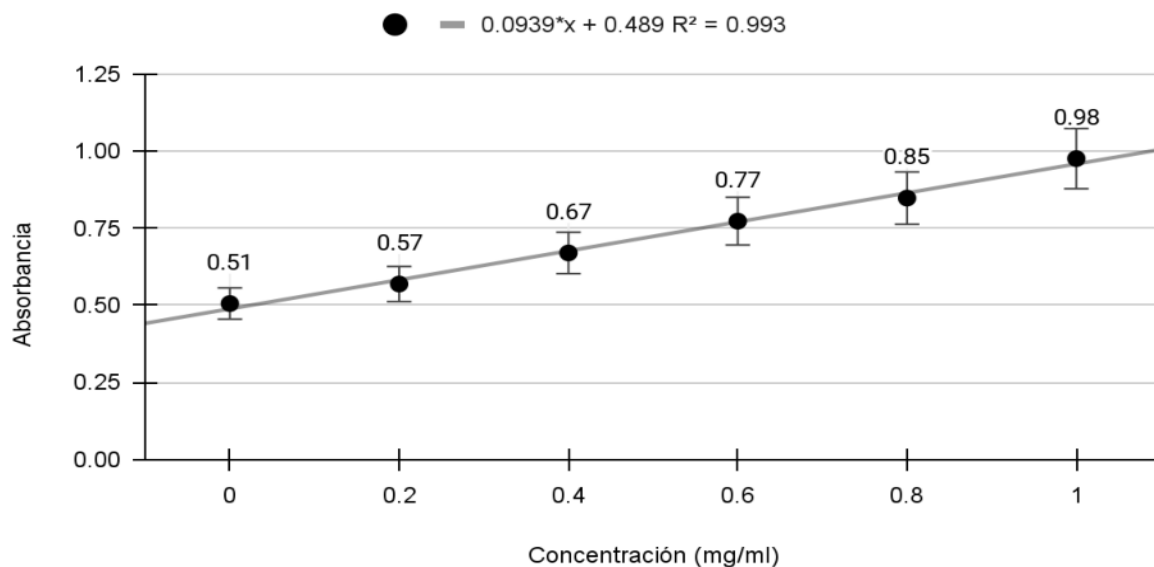


Figura 3. Curva de calibración de albúmina sérica bovina en celda.

Determinación de proteínas totales en microplaca

La concentración de proteína en microplaca se determinó mediante el método de Bradford, utilizando como estándar BSA (albúmina sérica bovina). La reacción se compone de 200 µl de

reactivo de Bradford 1x y 20 µl de muestra proteica, la cual se homogeniza suavemente y deja reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos resguardada de la luz; posteriormente, se mide la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína total (mg/mL) se calculó mediante una curva de calibración con BSA en concentraciones de 0.625 a 0.5 mg/mL mediante una dilución en serie (Figura 4). Todas las mediciones se realizaron en triplicado.

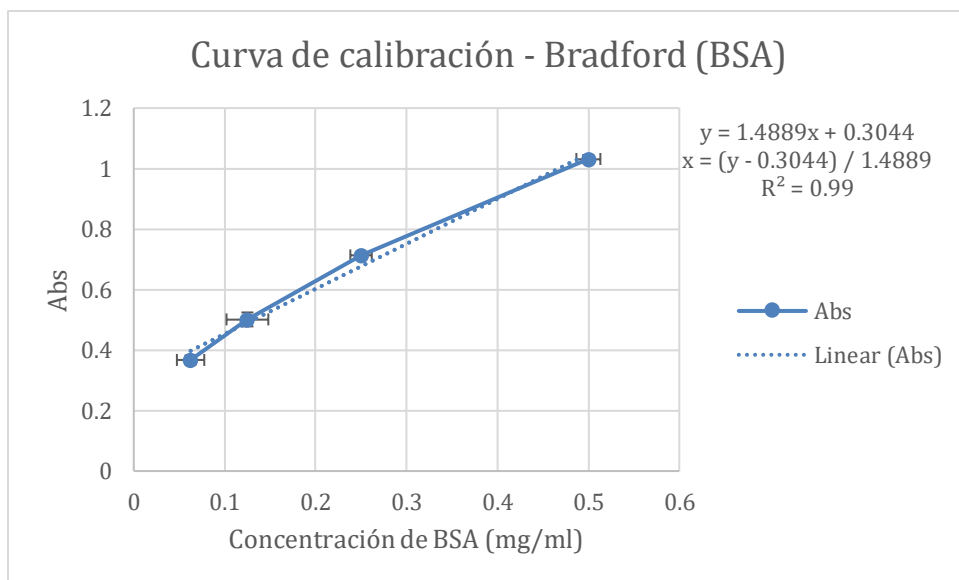


Figura 4. Curva de calibración de albúmina sérica bovina en microplaca.

6.8 Caracterización del extracto crudo: impacto de la temperatura, el pH y la afinidad por el sustrato en la actividad enzimática

Para determinar las condiciones óptimas de reacción del extracto, se analizó el mismo en un rango de temperaturas de 30-50°C y en niveles de pH de 5-10. El pH de cada buffer se ajustó a la temperatura de reacción del extracto enzimático. Los tampones empleados (50 mM) fueron buffer de acetatos (pH 5 y 6), buffer de fosfatos (pH 7 y 7.5), buffer de Tris-HCl (pH 8-9) y buffer de Carbonatos (pH 9.5-10). Se evaluaron los efectos tanto de temperatura como de pH usando 4-nitrofenil acetato (pNPA) como sustrato, en combinación con el buffer de trabajo y el extracto enzimático, midiendo la absorbancia de forma continua mediante espectrofotometría a 405 nm.

Además, se evaluó la afinidad del extracto enzimático hacia diversos sustratos para determinar si su actividad principal corresponde a lipasa o esterasa, en función de la preferencia por cada sustrato. Estos compuestos, que son ácidos grasos de diferentes longitudes (ácido acético C:2, ácido butírico C:4 y ácido octanóico C:8), son esterificados con 4-nitrofenol y utilizados como

sustratos: p-nitrofenil acetato (4-NPA), 4-nitrofenil butirato(4-NPB) y de 4-nitrofenil octanoato (4-NPO).

6.9 Purificación por cromatografía de exclusión por tamaño y determinación del peso molecular

El extracto crudo se cargó en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño empacada con Sephadex G-100 (fase estacionaria), se dejó sedimentar toda la noche y luego se equilibró. Se eliminó el exceso de muestra pasando un volumen de agua destilada a un flujo de 0.5 mL/min. Después, se lavaron con dos volúmenes de tampón Tris-HCl 0.15 M (pH 8.5) como fase móvil. Las fracciones enzimáticas con mayor actividad de esterasa, obtenidas por cromatografía en columna, se mezclaron y concentraron por ultrafiltración usando una membrana con un punto de corte de 50 kDa. Finalmente, se comparó la actividad específica de la enzima purificada con la de la enzima cruda y se calculó el factor de purificación.

La masa molecular relativa de la enzima semipurificada, obtenida de las fracciones de la cromatografía de exclusión por tamaño, se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles, que tenían un 12% de acrilamida, fueron teñidos con Azul de Coomassie R250 y se utilizó el estándar de proteínas pre-teñido Invitrogen™ SeeBlue™ (Fisher-Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) como marcador de peso molecular (3-198 kDa).

7. Resultados y Discusión

7.1 Reactivación e Identificación de la Cepa de *Serratia marcescens* 11E

La cepa de *Serratia marcescens* 11E mostró crecimiento en el cultivo en caldo LB-Miller, evidenciado por la turbidez del medio y su color rosado-rojizo (Figura 5). Además, el crecimiento en agar LB fue claramente visible, formando colonias pequeñas, redondas y rojas con bordes lisos. Estas colonias tuvieron un tono rojizo que se oscureció con el tiempo de incubación. La producción de prodigiosina, un pigmento característico de la especie varía con la temperatura de incubación y se inhibe aproximadamente a los 37°C (Arifiyanto et al., 2022). Además, como se observa en la

figura 4, la tinción de Gram fue negativa, indicando que la bacteria tiene una morfología de bacilos (bastón) con extremos redondeados.

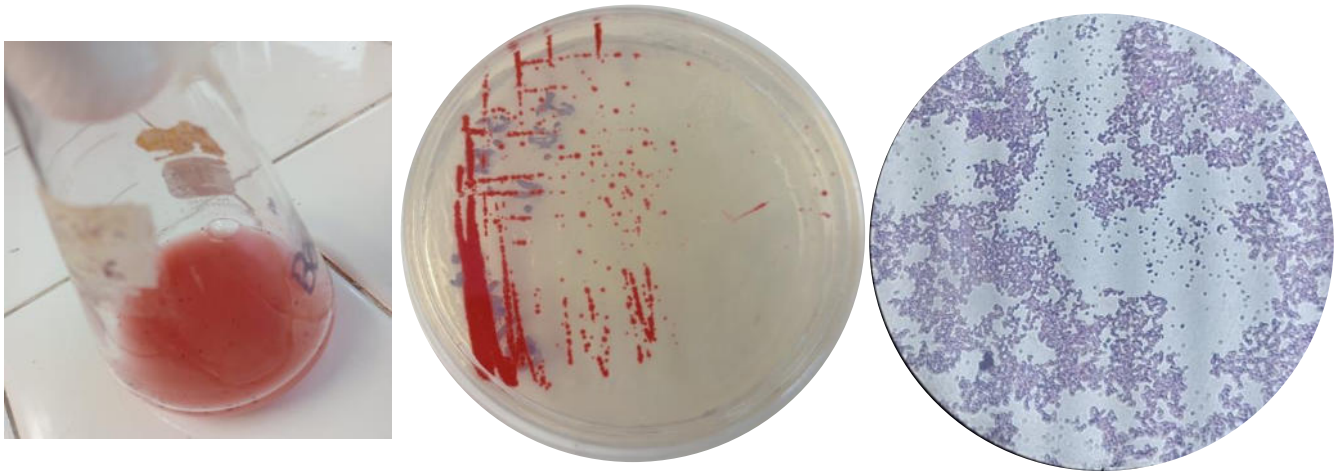


Fig. 5. Aspecto de *Serratia marcescens* 11E inoculada en caldo LB (izquierda), en agar LB (centro) después de 24 h de incubación a 30°C y tinción de Gram (derecha).

Los resultados de la prueba API20E, realizada con el mismo medio de cultivo que las demás pruebas de identificación, mostraron el número de identificación ID 5001641 (Ver Figura 6).



Figura 6. Identificación positivo de la muestra como *Serratia marcescens*, mostrando un número de identificación ID 5001641.

El número de identificación de la Prueba API20E indica que la cepa es positiva para la especie *Serratia marcescens* al compararse con los datos del estándar de la prueba, presentados en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados de prueba API20E mostrando el porcentaje de reacciones positivas reportadas para *Serratia marcescens* (bioMérieux, 2010).

Resultados de prueba API20E								
Prueba	Resultado	% de identidad	Prueba	Resultado	% de identidad	Prueba	Resultado	% de identidad
ONPG	+	94	TDA	-	0	SOR	+	98
ADH	-	0	IND	-	1	RHA	-	1
LDC	+	95	VP	+	70	SAC	+	99
ODC	+	95	GEL	+	87	MEL	+	68
CIT	+	96	GLU	+	100	AMY	+	97
H2S	-	0	MAN	+	99	ARA	+	25
URE	-	25	INO	+	85	OX	-	0

ONPG: Prueba de β -galactosidasa; ADH: Prueba de L-arginina, LDC: Prueba de Lisina, ODC: Prueba de Ornitina, CIT: Prueba de uso de Citrato, H2S: Prueba de producción de Ácido Sulfhídrico, URE: Prueba de Ureasa, TDA: Prueba de Triptófano desaminasa, IND: Prueba de Indol, VP: Prueba de Voges-Proskauer (vía del butilenglicol), GEL: Prueba de Gelatinasa, GLU: Prueba de fermentación de Glucosa, MAN: Prueba de fermentación de Manosa, INO: Prueba de fermentación de Inositol, SOR: Prueba de fermentación de Sorbitol, RHA: Prueba de fermentación de Ramnosa, SAC: Prueba de fermentación de Sucrosa, MEL: Prueba de fermentación de Melibiosa, AMY: Prueba de fermentación de Amigdalina, ARA: Prueba de fermentación de Arabinosa, OX: Prueba de Oxidasa.

7.2 Prueba cualitativa de producción de biofilms por *Serratia marcescens* 11E

La cepa de *Serratia marcescens* analizada creció en el agar Rojo Congo, presentando colonias negras, opacas, de textura dura y poco brillo, lo que indica la formación de biofilms (Figura 7), ya que esta prueba detecta la producción de exopolímeros, como las proteínas Curli y el betaglicano, componentes comunes de los biofilms, que interactúan con el pigmento y producen la coloración negra (Freeman et al., 1989; Reichhardt et al., 2015). La especie *S. marcescens*, en

general, ha sido ampliamente reportada como productora de biofilms, lo que contribuye a su resistencia a agentes antimicrobianos y a su potencial como patógeno oportunista, especialmente en infecciones de tractos nasofaríngeos; la formación de estos biofilms está regulada por el quorum sensing y la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo (Rice et al., 2005). Aunque la prueba de Rojo Congo en agar se utilizó como método confirmatorio para la documentación de la especie, es importante tener en cuenta que su sensibilidad varía entre distintos microorganismos.



Figura 7. Prueba cualitativa de producción de biofilms en la cepa *Serratia marcescens* 11E en agar rojo Congo.

7.3 Prueba cualitativa de actividad enzimática

El ensayo cualitativo en agar tributirina suplementado con Tween 80 confirmó que *Serratia marcescens* 11E secreta enzimas hidrolíticas capaces de romper enlaces éster. Tras 48 horas de incubación a 30 °C, las colonias desarrollaron amplios halos blancos opacos alrededor de la zona de crecimiento, lo que indica la hidrólisis activa enlace éster del Tween (éster de sorbitol unido a una molécula de ácido oleico, 18C) y utilizar al ácido graso como fuente de carbono y por ende la liberación de sales de ácidos grasos insolubles (Figura 8). Estos hallazgos confirman que la cepa expresa hidrolasas capaces de degradar los enlaces éster de los triglicéridos de cadena corta y

media. Este fenotipo es típico de microorganismos que producen esterasas o lipasas extracelulares, lo que resalta el potencial de la cepa para aplicaciones biocatalíticas.

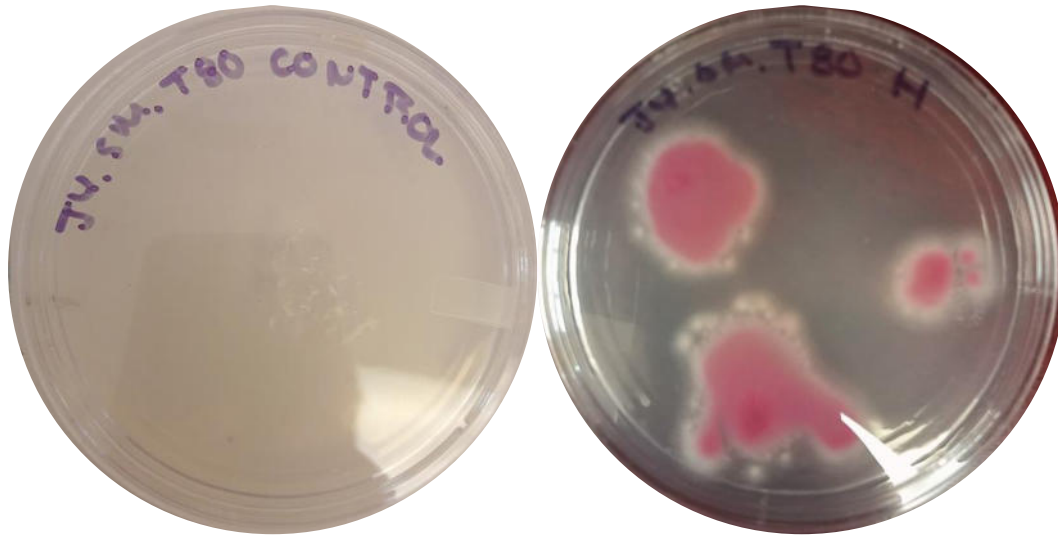


Figura 8. Placa de control con agar tributirina suplementado con Tween 80 (izquierda) y placa inoculada con *Serratia marcescens* incubada a 30 °C durante 48 horas, mostrando halos de degradación (derecha).

Si bien esta prueba es una indicación cualitativa de actividad enzimática capaz de hidrolizar el enlace éster, no determina de forma definitiva el tipo de enzima o enzimas responsables de la hidrólisis, por lo que esta actividad puede ser resultado de la acción tanto de una esterasa como de una lipasa. En el caso de este estudio, el grosor del halo de hidrólisis fue delgado (<2 mm), lo que indica de forma preliminar que la cepa produjo una esterasa; ya que, a diferencia de una lipasa, las esterasas tienen una mayor afinidad por ácidos grasos con una longitud de cadena de ocho o menos carbonos, pese a que puedan a menor medida hidrolizar moléculas con ácidos grasos de mayor número de carbonos (Patel et al. 2023).

7.4 Condiciones de la fermentación en estado sólido para la producción de enzimas

Los sustratos sólidos examinados incluyen café gastado, residuos de pan y cera vegetal, mientras que los líquidos son aceite quemado y suero de leche. Para determinar las condiciones óptimas de fermentación y producción de enzimas, se diseñó un ensayo exploratorio tipo Plackett-Burman. Como respuesta, se evaluó la actividad enzimática del extracto crudo empleando 4-nitrofenil butirato como sustrato. Los resultados se analizaron automáticamente mediante el programa Design Expert 13.

Como se muestra en la Tabla 10, el diseño de experimentos reveló que los sustratos con mayor actividad enzimática promedio fueron con los residuos sólidos de pan (0.013 U/mL), seguidos de la cera vegetal (0.011 U/mL). En los sustratos líquidos, las combinaciones con suero de leche mostraron la mejor actividad enzimática (0.012 U/mL). La combinación que presentó la mayor respuesta (0.018 U/mL) fue la de cera vegetal y suero de leche en una proporción de 80:20.

Tabla 10. Factores relevantes y actividad volumétrica (U/mL) de las corridas del diseño experimental.

Corrida	°C	pH	h	Inóculo (%)	Fuentes de carbono	Actividad volumétrica (U/mL)
1	30	9	36	0.5	Café/Suero - 80:20	0.003
2	30	9	14	1	Café/Suero - 80:20	0.014
3	30	9	14	1	Pan/Aceite - 80:20	0.009
4	37	5	36	0.5	Pan/Suero - 70:30	0.013
5	30	5	14	1	Café/Suero - 70:30	0.01
6	37	5	14	1	Cera/Aceite - 70:30	0.004
7	37	5	36	1	Cera/Suero - 80:20	0.012
8	37	5	36	0.5	Pan/Suero - 70:30	0.013
9	30	5	14	0.5	Cera/Suero - 80:20	0.013
10	37	9	14	0.5	Cera/Suero - 80:20	0.016
11	30	9	36	1	Cera/Suero - 80:20	0.018
12	37	9	36	1	Cera/Suero - 80:20	0.009
13	37	5	14	0.5	Cera/Suero - 80:20	0.009
14	30	5	36	0.5	Cera/Aceite - 70:30	0.009
15	30	5	14	1	Café/Suero - 80:20	0.009

Según los resultados, la mezcla de suero y cera sirvió como una fuente eficaz de nutrientes para el crecimiento y la producción enzimática. El suero contiene azúcares fácilmente asimilables y pequeñas cantidades de proteínas, mientras que la cera aportó ácidos grasos de cadena larga que pueden estimular la expresión de hidrolasas (Adlan et al., 2020). Esta estrategia de sustrato mixto

es consistente con reportes previos, en los que se observa que el género *Serratia* muestra una producción enzimática diferenciada y sensible a la composición del medio de crecimiento; con sustratos ricos en lípidos actuando como inductores de enzimas hidrolíticas, este comportamiento se ha reportado en presencia de aceites, ceras, triglicéridos y surfactantes, así como en condiciones de baja disponibilidad de agua como lo es en sistemas de fermentación en estado sólido (Henriette et al., 1993; Nascimento et al., 2022).

7.5 Caracterización de Sustratos

Se decidió enviar a caracterizar al Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León los sustratos que mostraron una mayor respuesta en actividad enzimática, estos sustratos fueron el suero de leche (producción de queso panela) y la cera vegetal (en escamas). La caracterización fisicoquímica del suero de leche utilizado se presenta en la Tabla 11, donde se observa un alto contenido de humedad (93.86%), niveles moderados de carbohidratos (4.20%) y un bajo contenido de proteínas (0.20%), similar al de los efluentes lácteos típicos.

Tabla 11. Perfil fisicoquímico de muestra de suero de leche.

Suero de leche	
Determinación	Valor
Humedad (%)	93.86
Azúcares totales (%)	3.78
Carbohidratos totales (%)	4.20
Proteína (%)	0.20
Grasa (%)	1.22
Ceniza (%)	0.52
NaCl (%)	0.23
pH directo	6.0

Por otro lado, en la Tabla 12, observamos que el sustrato de cera presenta un contenido de 70.32% de ácidos grasos saturados, incluyendo componentes importantes como el ácido margárico (C17:0), el ácido esteárico (C18:0) y el ácido araquidónico (C20:4). Además, presenta una cantidad significativa de ácidos grasos poliinsaturados (29.68%). Debido a esto, la mezcla de cera y suero de leche ofrece nutrientes tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, proporcionando una fuente de carbono equilibrada que permite a *S. marcescens* degradar carbohidratos y lípidos simultáneamente durante la fermentación en estado sólido, lo que favorece la producción de enzimas.

Tabla 12. Perfil de ácidos grasos de la cera vegetal.

Cera vegetal	
Determinación	Valor
Ácidos grasos saturados (%)	70.32
Ácidos grasos monoinsaturados (%)	<0.10
Ácidos grasos poliinsaturados (%)	29.68
Ácido pentadecanóico (%)	4.50
Ácido palmítico (%)	7.14
Ácido margárico (%)	14.0
Ácido esteárico (%)	13.56
Ácido linoléico (%)	11.69
Ácido araquidónico (%)	15.24
Ácido eicosadienoico (%)	10.49
Ácido behénico (%)	6.94
Ácido docosadienóico (%)	7.50
Ácido lignocérico (%)	8.94

7.6 Evaluación de actividad enzimática del extracto crudo bajo las condiciones seleccionadas de fermentación sólida

Las condiciones para la producción enzimática consistieron en una fermentación sólida en un medio formado por 50 g de una mezcla de cera y suero de leche (80:20, respectivamente), inoculado con 1% (v/v) de la bacteria a una densidad óptica inicial (D600) de 0.1. Para ello, se utilizó un cultivo de 24 horas de *Serratia marcescens* 11E en caldo LB-Miller como inóculo. La fermentación duró 48 horas a 30 °C y pH 9.

Tras la fermentación, se recolectó el sobrenadante libre de células mediante centrifugación a 9000 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Este sobrenadante, conocido como extracto crudo, fue concentrado por ultrafiltración utilizando una membrana de tamaño de corte de 50 kDa, para luego determinar su concentración de proteína y su perfil de actividad enzimática, la cual se muestra en la Figura 9.

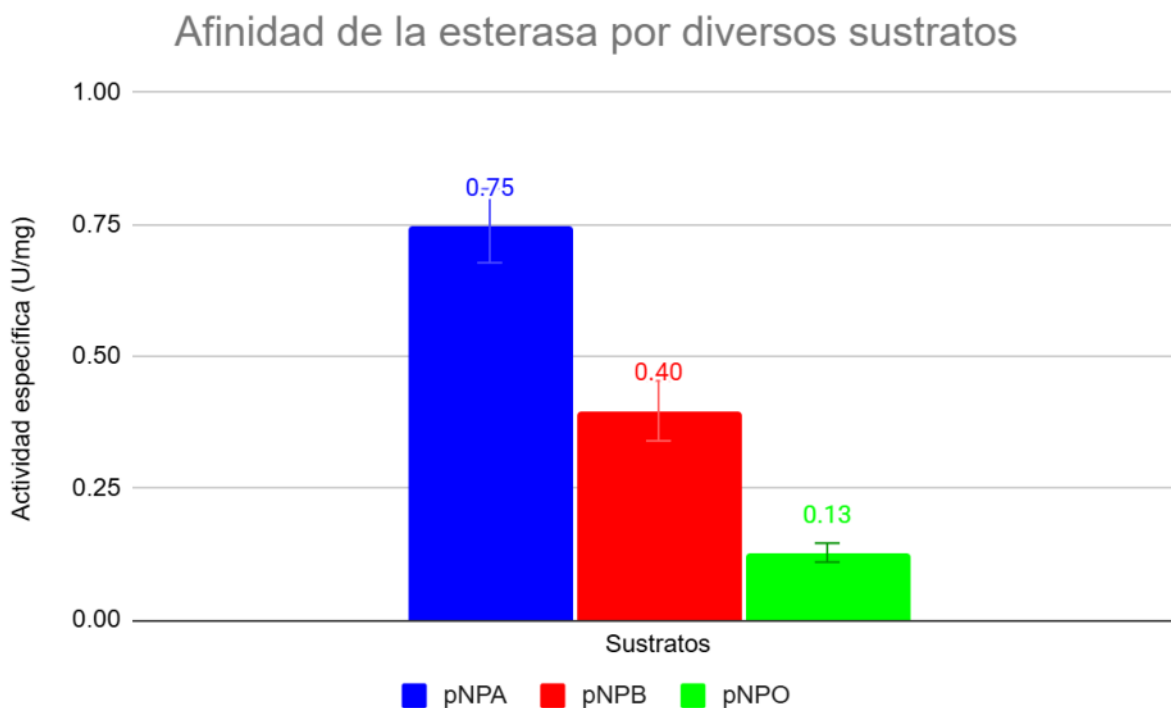


Figura 9. Actividad del extracto crudo ante los sustratos 4NPA (p-nitrofenil acetato, 2C), 4NPB (p-nitrofenil butirato, 4C) y 4NPO (p-nitrofenil octanoato, 8C); n=3.

El extracto crudo obtenido tras la fermentación fue de aproximadamente 10 mL por lote, con una concentración proteica promedio de 0.394 mg/mL. Por otro lado, los ensayos de actividad enzimática indicaron la mayor actividad frente al 4-nitrofenil acetato (0.743 U/mg), disminuyendo significativamente a medida que aumentaba la longitud de la cadena: de 4-nitrofenil butirato (0.399

U/mg) y 4-nitrofenil octanoato (0.125 U/mg). La actividad disminuyó gradualmente a medida que aumentaba la longitud de la cadena del sustrato, lo que indica una marcada preferencia por los ésteres de cadena corta: 4NPA (C2) > 4NPB (C4) > 4NPO (C8). Esta marcada dependencia de la longitud de la cadena sugiere un perfil típico de esterasas en lugar de lipasas, que generalmente prefieren triglicéridos de cadena larga (Fojan et al., 2000).

En este sentido, el género *Serratia* sp. puede producir hidrolasas que actúan tanto como esterasas como como lipasas; sin embargo, su expresión depende de la especie y de las condiciones ambientales. La composición del medio de cultivo puede favorecer la producción de esterasas debido a la naturaleza de la cera, que, por su baja capacidad de emulsificación, no genera una interfaz graso-acuoso necesaria para inducir y activar la lipasa en la superficie (Bhardwaj et al., 2021; Mohanasrinivasan et al., 2018). La cera vegetal, especialmente cuando se presenta en láminas delgadas, funciona como soporte sólido para el crecimiento bacteriano y puede ser un inductor potencial de la expresión de esterasas que hidrolizan ésteres solubles, que no requieren una interfaz agua-aceite para su acción, asimismo, la pobre capacidad de la cera para emulsificarse puede ser un factor que limite la accesibilidad de los lípidos de cadena larga de la misma, siendo en cambio los lípidos y ésteres solubles residuales los que actúen como inductor enzimático, es posible que, a diferencia de otros sustratos agroindustriales, como bagazos de la producción de aceite, esta diferencia en la accesibilidad de lípidos de cadena larga y de la presencia de una interfaz agua-aceite sea un factor determinante en la expresión de lipasas u otro tipo de esterasas. En cuanto a la especificidad de este tipo de enzimas, se ha reportado para esterasas de *Serratia* una preferencia por sustratos de cadena corta, específicamente ésteres de cadena C2-C4, y presentando una actividad significativamente menor ante sustratos de cadena larga; este patrón ha sido observado en enzimas caracterizadas mediante el uso de sustratos del tipo p-nitrofenil éster, donde las máximas de actividad corresponden a los ésteres de acetato y butirato, mientras que esta actividad disminuye conforme incrementa la longitud de la cadena acílica (Jiang et al., 2016). Por lo tanto, la preferencia de sustrato observada en este estudio es totalmente consistente con el comportamiento bioquímico establecido de las esterasas de *Serratia*.

7.7 Caracterización del extracto crudo: impacto de la temperatura, el pH y la afinidad por el sustrato en la actividad enzimática

Para determinar las condiciones óptimas de reacción, el efecto de la temperatura y pH fueron evaluados para el extracto crudo en rangos de 30-50°C y pH 5-10, en el caso de la determinación de pH se realizaron mediciones de punto final (5 minutos de reacción), debido a la imposibilidad de realizar mediciones directas continuas en el rango completo de pH evaluado debido a la protonación del cromóforo; por su parte, en el caso de la determinación de temperatura óptima, se realizaron cinéticas de 15 minutos, con mediciones cada 60 segundos. El pH de cada sistema amortiguador se ajustó específicamente a la temperatura de reacción correspondiente. Los sistemas amortiguadores empleados (50 mM) consistieron en buffer de acetatos (pH 5 y 6), buffer de fosfatos (pH 7 y 7.5), buffer de Tris-HCl (pH 8-9) y buffer de Carbonatos (pH 9.5-10). Los ensayos se llevaron a cabo utilizando 4-nitrofenil acetato (pNPA) con concentración final 0.5 mM como sustrato, en combinación con el respectivo buffer y extracto enzimático crudo; la actividad se cuantificó mediante espectrofotometría en una longitud de onda de 405 nm.

Se observó que el extracto crudo mostro un perfil de actividad alcalófilo mesófilo, con una retención de actividad relativa sobre el 50% en condiciones neutro-alcálinas y temperaturas moderadas. Estos hallazgos demuestran que la enzima es moderadamente termoestable y presenta un buen desempeño en ambientes básicos, lo cual resulta beneficioso para aplicaciones en detergentes, biode detergentes y bioprocesos ambientales. En términos de pH, el extracto presentó una máxima de actividad a pH 9.5, mostrando un pico secundario a pH 7.5 (Figura 10), lo cual sugiere la presencia de isoformas o al menos dos enzimas con actividad sobre ésteres en el extracto. En cuando a la temperatura, se observó una máxima de actividad a los 40°C, reteniendo más de un 70% de actividad en un rango de 35-45°C, lo que sugiere un comportamiento mesófilo, teniendo a los 30°C y 50°C una retención de actividad sobre el 50% (Figura 11). Estas observaciones son consistentes con otras esterases previamente reportadas para el género *Serratia*, que si bien pueden mostrar una gran variabilidad en sus propiedades catalíticas (como es el caso de enzimas psicrófilas), generalmente presentan mayor actividad y estabilidad en condiciones mesófilas (30-40°C) y en condiciones de pH neutras a moderadamente alcalinas (7-9) (Bhardwaj et al., 2021; Jiang et al., 2016).

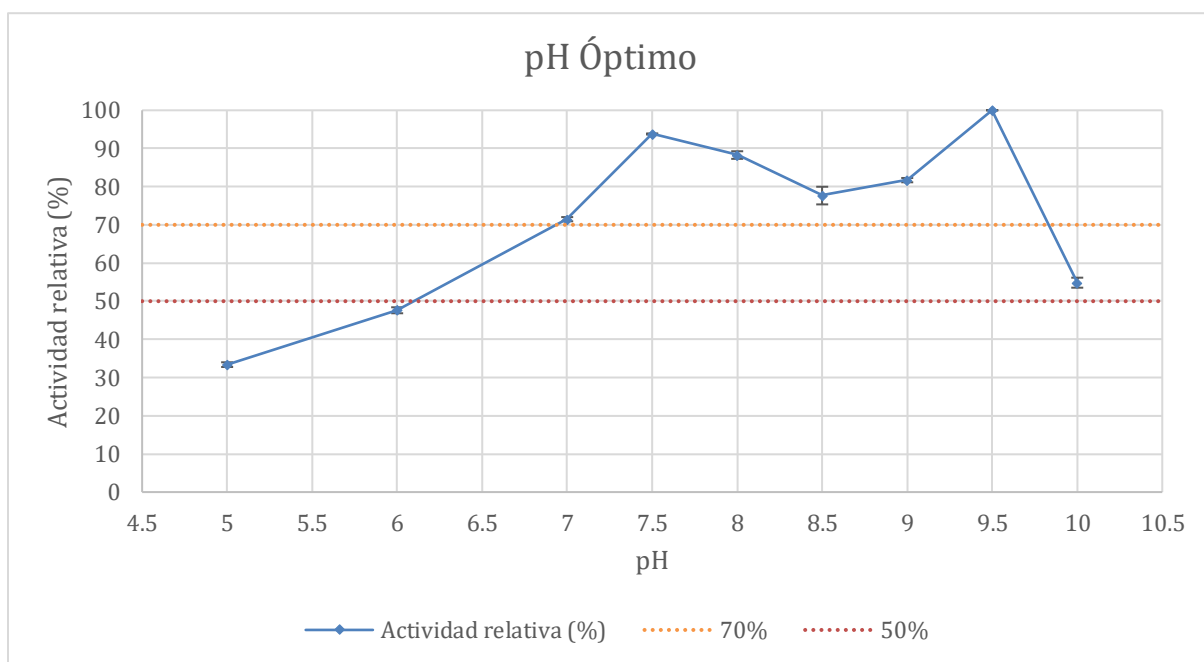


Figura 10. Actividad relativa (%) del extracto concentrado (lote único, 1.82 mg/mL pts.) en pH 5-10. Sustrato: 4NPA (p-nitrofenil acetato). Condiciones de reacción: 5 min, buffer 50 mM, 50°C, 0.2 U extracto; n=3.

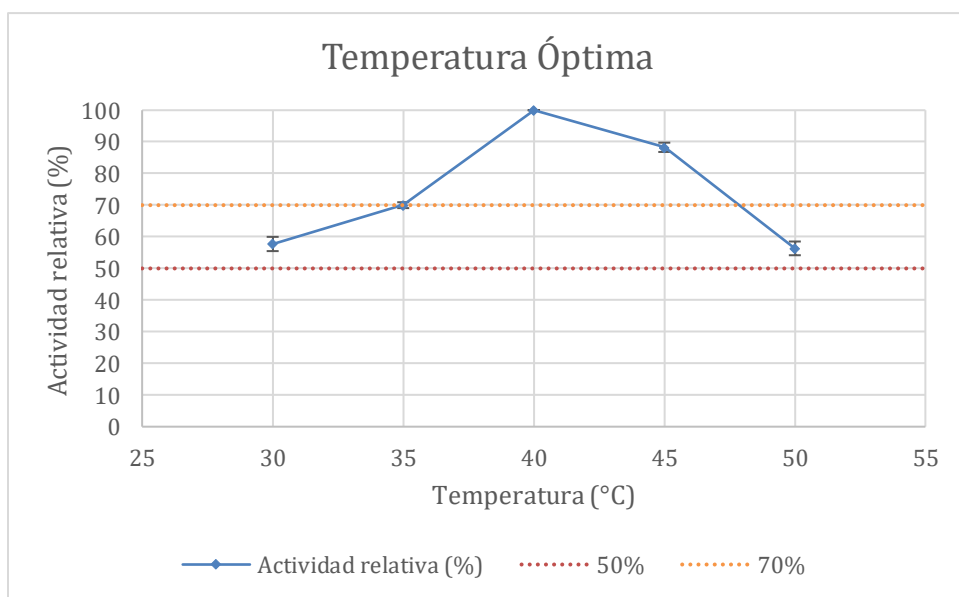


Figura 11. Actividad relativa (%) del extracto concentrado (lote único, 1.82 mg/mL pts.) en Temperaturas de 30-50°C. Sustrato: 4NPA (p-nitrofenil acetato). Condiciones de reacción: 5 min, buffer Tris-HCl 50 mM pH 9.5, 0.2 U extracto; n=3.

Cinéticas de consumo en condiciones óptimas y estimación de constantes cinéticas aparentes

Se realizaron cinéticas de consumo en condiciones óptimas de reacción con el extracto enzimático utilizando pNPA como sustrato en concentraciones de 0.1-0.5 mM de una duración total de 30 minutos, con mediciones cada 60 segundos (Figura 12).

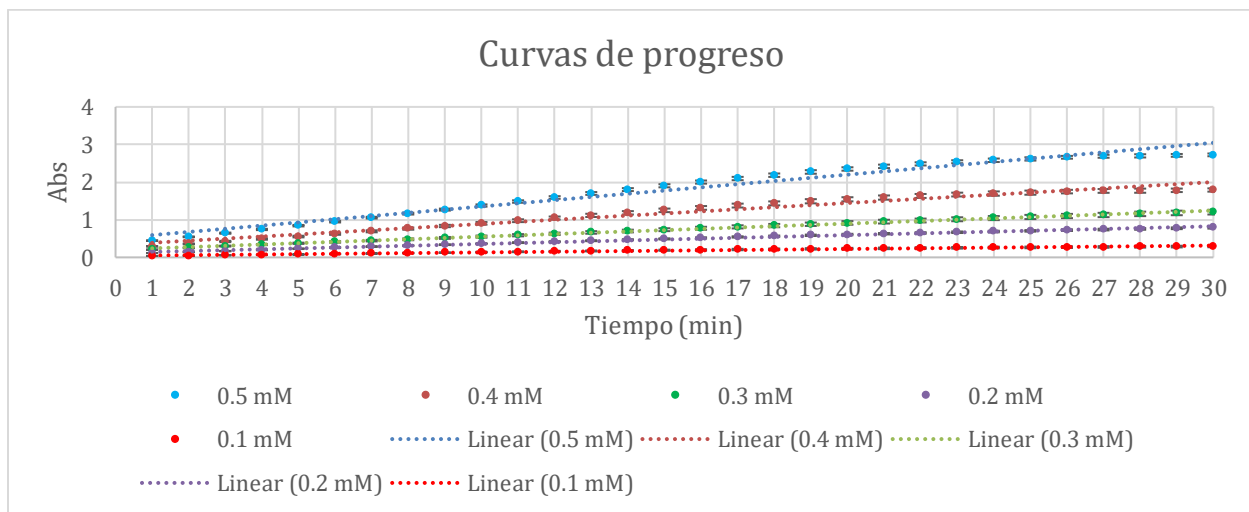


Figura 12. Cinética enzimática a 30 minutos con pNPA (p-nitrofenil acetato) en rango de concentración 0.1-0.5 mM, n=3. Condiciones de reacción: 30 min, medición continua (1 min), pH 9.5 50 mM, 40°C, sustrato 0.1-0.5 mM, 0.2 U extracto.

La absorptividad del cromóforo (para-nitrofenolato) impide realizar mediciones directas sin dilución previa en concentraciones de producto mayores a aproximadamente 0.237 mM, debido a que la absorbancia sale del rango lineal del equipo utilizado (1.5 abs), lo que impidió observar la depleción del sustrato, y limita significativamente el tiempo de reacción que es posible monitorear a concentraciones de sustrato mayores a las ensayadas, debido al aumento del ratio de hidrólisis tanto enzimático como no enzimático de los ésteres de para-nitrofenol. Sin embargo, las condiciones de reacción si permiten medir la zona lineal de la curva de consumo, por lo que es posible determinar las velocidades iniciales de reacción a las concentraciones de sustrato ensayadas, las cuales se detallan en la Tabla 13.

Tabla 13. Actividad total (U), volumétrica (U/ml) y específica (U/mg) del extracto enzimático para pNPA (p-nitrofenil acetato) en un rango de concentración de sustrato 0.1-0.5 mM; n=3.

Concentración de sustrato	0.1 mM	0.2 mM	0.3 mM	0.4 mM	0.5 mM
Actividad total (U) (lote de 40 mL)	67.2 ± 2.4	191.6 ± 6	307.6 ± 14	470.8 ± 17.6	716 ± 15.2
Actividad volumétrica (U/mL)	1.68 ±0.06	4.79 ± 0.15	7.69 ± 0.35	11.77 ± 0.44	17.9 ± 0.38

Actividad específica (U/mg)	0.92 ± 0.037	2.63 ± 0.08	4.22 ± 0.19	6.46 ± 0.24	9.84 ± 0.21
Actividad por gramo de sustrato (U/gds)	1.32 ± 0.048	3.83 ± 0.12	6.15 ± 0.28	9.41 ± 0.35	14.32 ± 0.3

Al observar los valores en concentraciones de sustrato 0.5 mM, es posible observar una actividad específica superior a reportes previos en la literatura en cuanto a esterasas (1.19 U/mg) (Bhardwaj et al., 2021), mientras que la actividad por gramo de sustrato es comparable con los reportado previamente para enzimas lipolíticas (13.3 U/gds) (Gupta et al, 2013).

Debido a las limitaciones de medición impuestas por la absorptividad del cromóforo con relación al rango lineal de medición del equipo utilizado (BioTek Epoch2 microplate reader), el rango de datos disponible para el calculo de constantes cinéticas es insuficiente, debido a que no fue posible obtener datos de velocidad inicial en concentraciones de sustrato en y sobre saturación de este. Si bien es posible realizar una estimación de constantes cinéticas aparentes como lo son K_m' app y V_{max}' app, es importante mencionar que estos valores son poco fiables y posiblemente estén sobrestimados debido al rango limitado de datos disponibles.

Las constantes cinéticas aparentes fueron calculadas en base a las velocidades iniciales en condiciones de reacción óptimas y concentraciones de sustrato 0.1-0.5 mM, mediante el software GraphPad Prism 11 y un algoritmo de optimización GRG (Generalized Reduced Gradient) no linear, con un error cumulativo total de 0.00025. La K_m' app calculada fue de 84.84 mM, mientras que la V_{max}' app calculada fue de 1457.41 U/mg.

7.8 Determinación del peso molecular

Los resultados de la caracterización de pH y temperatura permitieron observar la posibilidad de encontrar una isoforma, a causa de los 2 picos observados (pH 9.5 y 7.5). Por lo cual, se empleó SDS-PAGE para estimar los pesos moleculares de las potenciales enzimas presentes en el extracto crudo (Figura 13). Para ello se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue™ como referencia (carril 1), una lipasa de *Pseudomonas fluorescens* como control (carril 2) y el extracto crudo de *S. marcescens* 11E (carril 3). En el carril de control (*P. fluorescens*) se

observaron dos bandas principales de aproximadamente 41 kDa y 10 kDa. El extracto crudo de *S. marcescens* 11E (carril 3) mostró una banda prominente alrededor de 40 kDa y otra más tenue cerca de 35 kDa, lo que sugiere la presencia de una enzima similar a una esterasa dentro del rango típico de peso molecular de las enzimas con pliegue de α/β hidrolasa. La banda de ~40 kDa coincide con las subunidades catalíticas identificadas en las esterasas derivadas de *Serratia*.

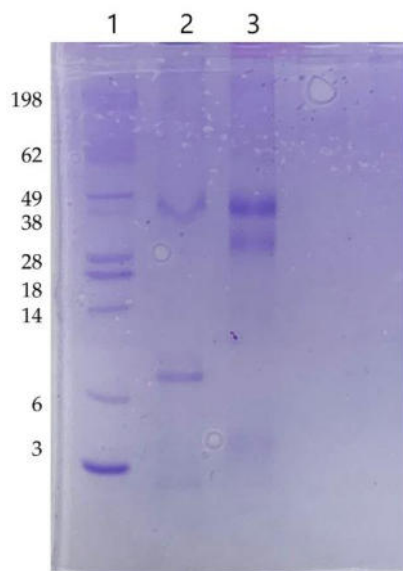


Figura 13. Gel de electroforesis: El carril 1 contiene el marcador de peso molecular, el carril 2 una lipasa de referencia proveniente de *Pseudomonas fluorescens* y el carril 3 contiene el extracto enzimático.

Además, el peso molecular determinado mediante SDS-PAGE respalda la hipótesis de que la enzima producida en este trabajo pudiera ser una esterasa. La banda principal, de aproximadamente 40 kDa, concuerda con las masas moleculares de las esterasas conocidas de *S. marcescens*, que generalmente varían entre 28 y 60 kDa por unidad (Akatsuka et al., 2003; Bhardwaj et al., 2021; Jiang et al., 2016). En contraste, las lipasas reportadas para *Serratia marcescens*, como LipA, tienden a presentar masas moleculares ligeramente mayores, dentro del rango de 50-65 kDa (Akatsuka et al., 1994).

Dado que los resultados del SDS-PAGE mostraron que el extracto enzimático tenía 2 bandas, se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño para intentar separar las potenciales isoformas de la esterasa. La muestra se cargó en una columna de 7.5 mL de volumen, con fase estacionaria de Sephadex G-200, empleando una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.15 M (pH 8.5) con un flujo de 0,5 mL/min. Se recolectaron 40 fracciones de 2 mL cada una y se midió su absorbancia a 280 nm. Las fracciones con mayor actividad esterasa se agruparon para estudios

posteriores, y su actividad (U/mL) se determinó usando 4-NPA (4-nitrofenil acetato) como sustrato (Figura 14).

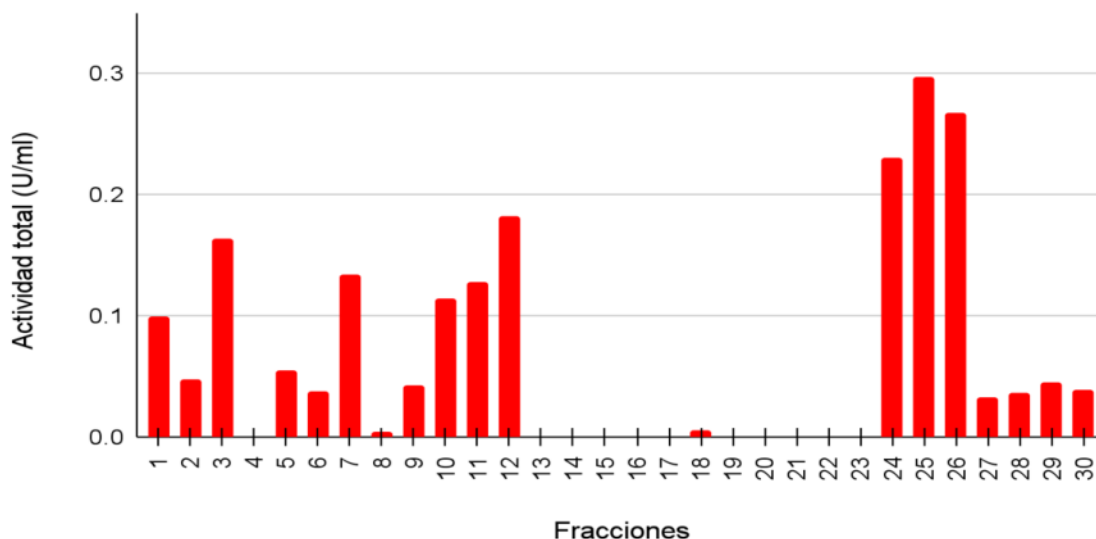


Figura 14. Fracciones obtenidas en la etapa cromatográfica con la resina Sephadex G-100.

Las fracciones con mayor actividad específica obtenidas mediante la cromatografía de exclusión por tamaño (fracciones 7-12 y 24-26) se concentraron mediante ultrafiltración con una membrana con tamaño de corte de 50 kDa. Posteriormente, estas fracciones se utilizaron para medir la actividad específica de la enzima semi purificada frente a los sustratos 4-nitrofenilo acetato (2C); 4-nitrofenilo butirato (4C); 4-nitrofenilo octanoato (8C). Los resultados se compararon con los obtenidos con la enzima cruda para determinar el factor de purificación calculado (Tabla 14).

Tabla 14. Tabla de rendimiento de purificación del extracto crudo y las fracciones obtenidas con la mayor actividad. Sustrato: 4-NPA (4-nitrofenil acetato).

Fase	Actividad (U/mL)	Actividad específica (U/mg)	Retención de la actividad (%)	Factor de Purificación
Extracto crudo	4.62	5.72	100	1
Fracciones 24-26	3.18	26.21	68.8	4.58
Fracciones 7-12	3.11	17.8	67.3	3.11

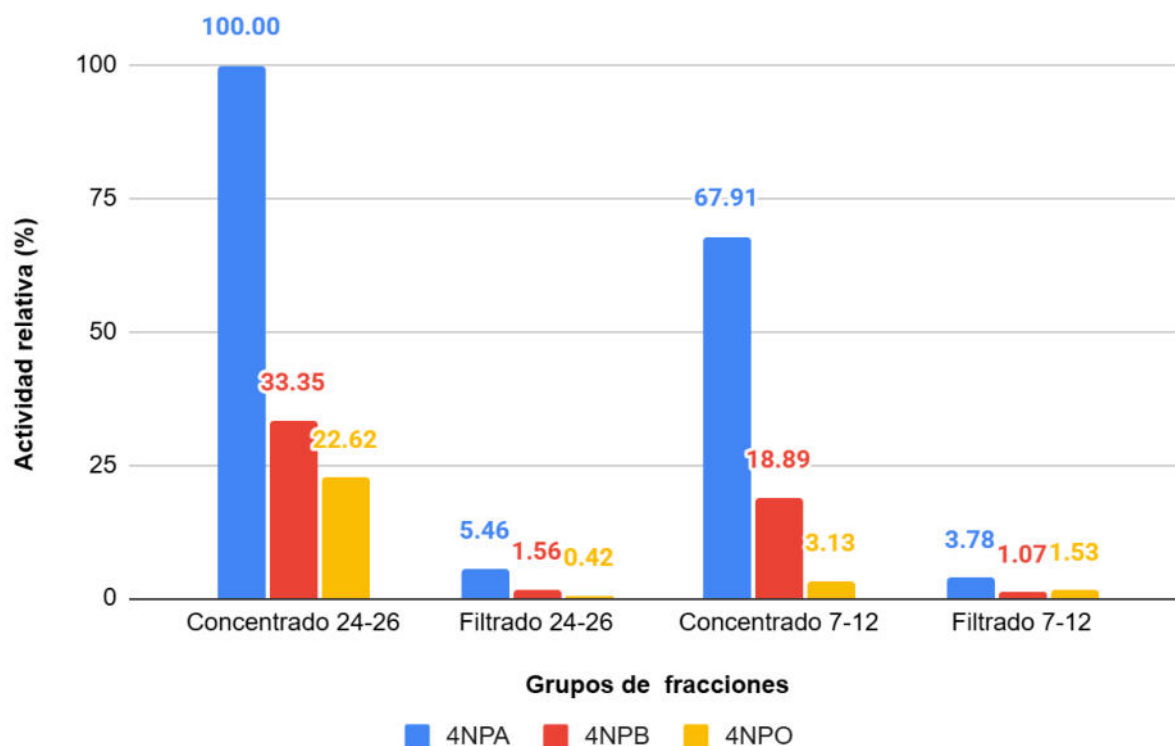


Figura 15. Actividad relativa (%) de las fracciones concentraciones y de sus filtrados ante diversos sustratos: 4NPA (p-nitrofenil acetato, 2C); 4 NPB (p-nitrofenil butirato, 4C); 4 NPO (p-nitrofenil octanoato, 8C). Condiciones de reacción: 5 min, punto final, pH 8.5, 50°C, sustrato 5 mM.

Los resultados de la purificación cromatográfica resaltan aún más la idoneidad de la enzima para el procesamiento posterior. La filtración en gel enriqueció con éxito la esterasa, alcanzando una actividad específica de 3 a 4.6 veces mayor, obteniendo fracciones con una reducción sustancial de contaminantes entre el 67 % y el 69 % de la actividad catalítica inicial. Esta retención es notable, ya que las enzimas derivadas de la fermentación en estado sólido suelen ser más difíciles de purificar en comparación con aquellas provenientes de sistemas de fermentación sumergida debido a la complejidad de las matrices de sustrato y a la mayor proporción de proteínas no enzimáticas (Mitchell et al., 2006; Sánchez, Oiza, Artola, Font, et al., 2024).

En conjunto, los resultados de este estudio concuerdan notablemente con datos publicados previamente sobre esterasas de provenientes de *S. marcescens* y amplían el conocimiento actual al demostrar que los residuos, específicamente el suero de leche y los residuos de cera, son sustratos eficaces para la producción de enzimas en condiciones de fermentación en estado sólido. Este enfoque contribuye al creciente interés por integrar la valorización de residuos con la bioproducción de productos de alto valor, lo que respalda las estrategias de economía circular.

8. Conclusiones

La cepa *Serratia marcescens* 11E fue reactivada con éxito, presentando características fenotípicas coherentes con la especie. Microscópicamente, mostró una morfología consistente con la literatura, identificada como bacilos Gram negativos. La identidad de la cepa fue confirmada mediante una prueba API20E (ID 5001641).

Respecto a las capacidades metabólicas de la cepa, su crecimiento en agar con Tween-80 generó un halo de hidrólisis, lo que indica que puede hidrolizar ésteres y aprovechar lípidos como fuente de carbono. Esto se confirmó cuantitativamente mediante una actividad específica de 0.351 U/mg en 4-nitrofenil butirato, un sustrato específico para esterasas y lipasas.

Se llevó a cabo un experimento exploratorio del tipo Plackett-Burman para evaluar diferentes sustratos sólidos (como café, pan y cera vegetal) y líquidos (suero de leche y aceite quemado) en la producción enzimática mediante la bacteria *Serratia marcescens* 11E en una fermentación sólida. La actividad enzimática del extracto crudo obtenido, mediante 4-nitrofenil butirato como sustrato, fue el factor de respuesta. Los resultados del diseño experimental mostraron que los sustratos con mayores actividades enzimáticas promedio fueron los residuos sólidos de pan (0.013 U/mL), seguidos de la cera vegetal (0.011 U/mL). Entre los líquidos, las mezclas con suero de leche presentaron la mejor actividad enzimática (0.012 U/mL). La combinación con mayor respuesta (0.018 U/mL) fue la de cera vegetal y suero de leche, en proporción 80:20.

Los resultados indican que la mezcla de suero y cera sirvió como una fuente eficaz de nutrientes para el crecimiento y la producción enzimática. El suero proporcionó azúcares fácilmente asimilables y pequeñas cantidades de proteínas, mientras que la cera suministró ácidos grasos de cadena larga que pueden promover la expresión de hidrolasas. Esta estrategia de uso combinado de sustratos coincide con estudios previos que muestran que las especies de *Serratia* reaccionan de manera interesante a sustratos ricos en lípidos, especialmente en ambientes de baja humedad típicos de los sistemas de fermentación en estado sólido (SSF).

Se caracterizaron los sustratos seleccionados, obteniéndose un suero de leche con un contenido lipídico superior al promedio (1.22%) (TetraPak, s/f), y una cera vegetal compuesta

principalmente de ácidos grasos saturados de cadena media-larga (70.3%); que si bien estos ácidos grasos no son los más adecuados como sustratos directos para una esterasa debido a su poca solubilidad, igualmente presentaron potencial como soporte de crecimiento e inductores enzimáticos.

Las condiciones establecidas para la producción enzimática consistieron en una fermentación sólida en un medio formado por 50 g de una mezcla de cera y suero de leche (80:20, respectivamente), inoculado con 1% (v/v) de la bacteria a una densidad óptica inicial (D600) de 0.1. Tras la fermentación (48 horas a 30 °C y pH 9), se recolectó el sobrenadante libre, conocido como extracto crudo, el cuál fue evaluado para establecer la afinidad de las enzimas a diferentes sustratos. Se observó una mayor actividad específica frente a 4-nitrofenil acetato (0.743 U/mg) en comparación con 4-nitrofenil butirato (0.399 U/mg) y 4-nitrofenil octanoato (0.125 U/mg), lo que indica que la actividad observada corresponde principalmente a una esterasa, y no a una lipasa como había sido planteado inicialmente.

El extracto crudo fue analizado para determinar las condiciones óptimas de actividad enzimática, identificando un rango de temperaturas de 30-50°C y pH de 5-10. La actividad aumentó notablemente de pH 9.5 a 7.5, alcanzando su punto máximo en pH 9.5, la presencia de este pico secundario sugiriendo la presencia de diversas enzimas o isoformas enzimáticas, para luego disminuir a partir de pH 10. En cuanto a temperatura, la máxima actividad se observó cerca de 40°C, con una inactivación térmica gradual a partir de 50 °C. Para estimar los pesos moleculares de las enzimas presentes en el extracto, se utilizó SDS-PAGE; el estudio mostró que el extracto crudo de *S. marcescens* 11E presenta una banda principal alrededor de 40 kDa y otra secundaria cerca de 35 kDa, sugiriendo la presencia de una enzima similar a una esterasa dentro de ese rango.

Dado que los resultados del SDS-PAGE mostraron que el extracto enzimático presentaba 2 bandas, se llevó a cabo una cromatografía para intentar separar las posibles isoformas de la esterasa. La muestra se cargó en una columna de Sephadex G-200, usando una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.15 M (pH 8.5) con un flujo de 0.5 mL/min, realizando así una cromatografía de exclusión por tamaño. Se recolectaron 40 fracciones de 2 mL cada una y se midió su absorbancia a 280 nm. Las fracciones con mayor actividad esterasa se agruparon para estudios futuros, y su actividad específica (U/mg) se determinó utilizando 4NPA (4-nitrofenil acetato) como sustrato. Las fracciones con mayor actividad específica mediante la cromatografía de exclusión (fracciones 7-12 y 24-26), mostraron una actividad enzimática de 17 y 26 U/mg, respectivamente.

Por lo tanto, se rechaza la hipótesis de este estudio, que indica que *Serratia marcescens* 11E puede producir enzimas extracelulares mediante fermentación en estado sólido, utilizando residuos ricos en lípidos de la industria alimentaria como sustrato en valores de actividad superiores a lo reportado en la literatura para la especie, sin embargo, el perfil de actividad no corresponde al de una lipasa, si no que se identifica como una actividad de tipo esterasa.

9. Perspectivas

Las aportaciones de este estudio establecen una base sólida para la valorización biotecnológica de residuos agroindustriales mediante el uso de *Serratia marcescens* 11E. Sin embargo, investigaciones futuras deberán enfocarse hacia la optimización del proceso de purificación mediante técnicas cromatográficas de mayor resolución para separar y caracterizar individualmente las dos potenciales isoformas detectadas, lo que permitiría determinar sus propiedades específicas y posibles aplicaciones.

A nivel de proceso, es necesario evaluar el escalamiento de la fermentación en estado sólido (SSF) permitiendo medir la factibilidad técnico-económica de producir estas esterasas a gran escala.

De la misma forma, es recomendable profundizar tanto en la caracterización funcional (estabilidad térmica, estabilidad en almacenamiento, tolerancia a solventes y tolerancia a iones metálicos) tanto del extracto como de las proteínas purificadas presentes en el mismo; así como el análisis estructural de las proteínas, incluyendo la evaluación de la activación interfacial o presencia del dominio “tapa” en las enzimas para diferenciar posibles lipasas verdaderas de esterasas e hidrolasas inespecíficas, así como estudios relacionados con la topología de la cavidad, diámetro, carga superficial e hidrofobicidad de la entrada a la misma, y estudios de dinámica molecular y mecánica cuántica (QM/MM) del sitio catalítico. Este tipo de análisis pueden elucidar de manera más clara el potencial catalítico de las enzimas presentes en el extracto.

Finalmente, la versatilidad de estas enzimas facilita diversas aplicaciones en biotecnología, como la biodegradación de polímeros sintéticos y la síntesis de ésteres de interés farmacéutico.

Por ello, sería recomendable investigar en estas áreas, promoviendo el uso de sustratos económicos como la cera vegetal y el suero de leche dentro de un modelo de economía circular.

10. Bibliografía

- Adlan, N. A., Sabri, S., Masomian, M., Ali, M. S. M., & Rahman, R. N. Z. R. A. (2020). Microbial Biodegradation of Paraffin Wax in Malaysian Crude Oil Mediated by Degradative Enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.565608>
- Akatsuka, H., Kawai, E., Omori, K., Komatsubara, S., Shibatani, T., & Tosa, T. (1994). The lipA gene of *Serratia marcescens* which encodes an extracellular lipase having no N-terminal signal peptide. *Journal of Bacteriology*, 176(7), 1949–1956. <https://doi.org/10.1128/jb.176.7.1949-1956.1994>
- Akatsuka, H., Kawai, E., Sakurai, N., & Omori, K. (2003). The *Serratia marcescens* *bioH* gene encodes an esterase. *Gene*, 302(1), 185–192. <https://doi.org/10.1016/S0378111902011502>
- Akram, F., Fatima, T., Shabbir, I., Haq, I. U., Ibrar, R., & Mukhtar, H. (2025). Abridgement of Microbial Esterases and Their Eminent Industrial Endeavors. *Molecular Biotechnology*, 67(3), 817–833. <https://doi.org/10.1007/s12033-024-01108-7>
- Ali, S., Khan, S. A., Hamayun, M., & Lee, I.-J. (2023). The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review. *Microorganisms*, 11(2), 510. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020510>
- Andrada, E., Mechoud, M. A., Abeijón-Mukdsi, M. C., Chagra Dib, E. P., Cerviño, S., Perez Chaia, A., & Medina, R. B. (2022). Ferulic Acid Esterase Producing *Lactobacillus*

- johnsonii from Goat Feces as Corn Silage Inoculants. *Microorganisms*, 10(9), 1732.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10091732>
- Arifiyanto, A., Damayanti, B., Putri, M. H., & Riyanto, C. L. R. (2022). Screening of the biodecolorization ability of synthetic dyes and the degradation of hydrocarbon bacteria *Serratia marcescens* MBC1. *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi*, 10(2), 244–252.
<https://doi.org/10.24252/bio.v10i2.32095>
- Bhardwaj, K. K., Kishen, S., Mehta, A., Sharma, A., & Gupta, R. (2021). Purification of high molecular weight thermotolerant esterase from *Serratia* sp. And its characterization. 3 *Biotech*, 11(6), 308. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02852-2>
- bioMérieux. (2010, mayo). *Sistema de identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos no exigentes*. bioMérieux. <https://quios.com.co/wp-content/uploads/2017/05/API-20E-FT.pdf>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Bulgari, D., Renzetti, S., Messgo-Moumene, S., Monti, E., & Gobbi, E. (2023). Optimization of Esterase Production in Solid-State Fermentation of Agricultural Digestate. *Fermentation*, 9(6), 524. <https://doi.org/10.3390/fermentation9060524>
- Cabrera, Ma. Á., & Blamey, J. M. (2018). Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments. *Biological Research*, 51(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0186-3>
- Canada, P. H. A. of. (2012, abril 30). *Pathogen Safety Data Sheets: Infectious Substances – Serratia spp.* [Education and awareness;guidance]. <https://www.canada.ca/en/public->

health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/serratia.html

- Castilho, L. R., Medronho, R. A., & Alves, T. L. M. (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 71(1), 45–50. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00058-9)
- Chandra, P., Enespa, Singh, R., & Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 169. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>
- Cheng, D., Liu, Y., Ngo, H. H., Guo, W., Chang, S. W., Nguyen, D. D., Zhang, S., Luo, G., & Bui, X. T. (2021). Sustainable enzymatic technologies in waste animal fat and protein management. *Journal of Environmental Management*, 284, 112040. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112040>
- Cirne, D. G., Paloumet, X., Björnsson, L., Alves, M. M., & Mattiasson, B. (2007). Anaerobic digestion of lipid-rich waste—Effects of lipid concentration. *Renewable Energy*, 32(6), 965–975. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2006.04.003>
- Environment, U. N. (2024, febrero 25). *Global Waste Management Outlook 2024 | UNEP - UN Environment Programme*. <https://www.unep.org/resources/global-waste-management-outlook-2024>
- Esakkiraj, P., Usha, R., Palavesam, A., & Immanuel, G. (2012). Solid-state production of esterase using fish processing wastes by *Bacillus altitudinis* AP-MSU. *Food and Bioprocess Technology*, 90(3), 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.008>

- Estimating WASH-related burden of disease*. (s/f). Recuperado el 3 de noviembre de 2025, de <https://www.who.int/activities/estimating-WASH-related-burden-of-disease>
- Fibriana, F., Upaichit, A., & Cheirsilp, B. (2021). Turning waste into valuable products: Utilization of agroindustrial oily wastes as the low-cost media for microbial lipase production. *Journal of Physics: Conference Series*, 1918(5), 052028. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1918/5/052028>
- Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. N., & Petersen, S. B. (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie, Lipase 2000*, 82(11), 1033–1041. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01188-3](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01188-3)
- Foo, W. H., Chia, W. Y., Tang, D. Y. Y., Koay, S. S. N., Lim, S. S., & Chew, K. W. (2021). The conundrum of waste cooking oil: Transforming hazard into energy. *Journal of Hazardous Materials*, 417, 126129. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126129>
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(8), 872–874. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>
- Godoy, C. A., Pardo-Tamayo, J. S., & Barbosa, O. (2022). Microbial Lipases and Their Potential in the Production of Pharmaceutical Building Blocks. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9933. <https://doi.org/10.3390/ijms23179933>
- Guerrand, D. (2017). Lipases industrial applications: Focus on food and agroindustries. *OCL*, 24(4), Article 4. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017031>
- Gupta, B., Gupta, K., & Mukherjee, S. (2013). Lipase production by *Serratia marcescens* strain SN5gR isolated from the scat of lion-tailed macaque (*Macaca silenus*) in Silent Valley

- National Park, a biodiversity hotspot in India. *Annals of Microbiology*, 63(2), 649–659.
<https://doi.org/10.1007/s13213-012-0515-7>
- Henriette, C., Zinebi, S., Aumaitre, M. F., Petitdemange, E., & Petitdemange, H. (1993). Protease and lipase production by a strain of *Serratia marcescens* (532 S). *Journal of Industrial Microbiology*, 12(2), 129–135. <https://doi.org/10.1007/BF01569913>
- Hölker, U., Höfer, M., & Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(2), 175–186.
<https://doi.org/10.1007/s00253-003-1504-3>
- Jeon, S., Hwang, J., Do, H., Le, L. T. H. L., Lee, C. W., Yoo, W., Lee, M. J., Shin, S. C., Kim, K. K., Kim, H.-W., & Lee, J. H. (2023). Feruloyl Esterase (LaFae) from *Lactobacillus acidophilus*: Structural Insights and Functional Characterization for Application in Ferulic Acid Production. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 11170.
<https://doi.org/10.3390/ijms241311170>
- Jiang, H., Zhang, S., Gao, H., & Hu, N. (2016). Characterization of a cold-active esterase from *Serratia* sp. And improvement of thermostability by directed evolution. *BMC Biotechnology*, 16(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0235-3>
- Juntachai, W., & Kajiwar, S. (2015). Differential Expression of Extracellular Lipase and Protease Activities of Mycelial and Yeast Forms in *Malassezia furfur*. *Mycopathologia*, 180(3–4), 143–151. <https://doi.org/10.1007/s11046-015-9900-7>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Le, L. T. H. L., Yoo, W., Jeon, S., Lee, C., Kim, K. K., Lee, J. H., & Kim, T. D. (2020). Biodiesel and flavor compound production using a novel promiscuous cold-adapted SGNH-type

- lipase (HaSGNH1) from the psychrophilic bacterium *Halocynthiibacter arcticus*. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01696-x>
- Londoño Hernandez, L., Ruiz, H. A., Ramírez Toro, C., Ascacio Valdes, A., Rodriguez Herrera, R., Aguilera Carbo, A., Tubio, G., Picó, G. A., Prado Barragan, A., Gutierrez Sanchez, G., & Aguilar, C. N. (2020). Advantages and Progress Innovations of Solid-State Fermentation to Produce Industrial Enzymes. En *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries*. Springer. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/167795>
- Long, Z.-D., Xu, J.-H., & Pan, J. (2007). Significant Improvement of *Serratia marcescens* Lipase Fermentation, by Optimizing Medium, Induction, and Oxygen Supply. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142(2), 148–157. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-0023-6>
- López-Gómez, J. P., Manan, M. A., & Webb, C. (2020). Chapter 7—Solid-state fermentation of food industry wastes. En M. R. Kosseva & C. Webb (Eds.), *Food Industry Wastes (Second Edition)* (pp. 135–161). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817121-9.00007-3>
- Martin del Campo, M., Camacho, R. M., Mateos-Díaz, J. C., Müller-Santos, M., Córdova, J., & Rodríguez, J. A. (2015). Solid-state fermentation as a potential technique for esterase/lipase production by halophilic archaea. *Extremophiles*, 19(6), 1121–1132. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0784-8>
- Mattedi, A., Sabbi, E., Farda, B., Djebaili, R., Mitra, D., Ercole, C., Cacchio, P., Del Gallo, M., & Pellegrini, M. (2023). Solid-State Fermentation: Applications and Future Perspectives for Biostimulant and Biopesticides Production. *Microorganisms*, 11(6), 1408. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061408>

- Mitchell, D. A., Berovič, M., Nopharatana, M., & Krieger, N. (2006). The Bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena. En D. A. Mitchell, M. Berovič, & N. Krieger (Eds.), *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation* (pp. 13–32). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-31286-2_2
- Mohanasrinivasan, V., Devi, C. S., Jayasmita, D., Selvarajan, E., & Jemimah Naine, S. (2018). Purification and Characterization of Extracellular Lipase from *Serratia marcescens* VITSD2. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(1), 373–381. <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0763-6>
- Mou, J.-H., Yan, W., Qin, Z.-H., Haque, M. A., Miao, Y.-H., Xin, F.-X., Wang, X., Fickers, P., & Lin, C. S. K. (2024). Food waste from various origins as feedstocks for recombinant protein production by *Yarrowia lipolytica* using *in situ* fibrous bed bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, 481, 148408. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.148408>
- Moya-Salazar, M. M., Moya-Salazar, J., Moya-Salazar, M. M., & Moya-Salazar, J. (2020). BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE ACEITE USADO DE COCINA POR HONGOS LIPOLÍTICOS: UN ESTUDIO IN VITRO. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 36(2), 351–359. <https://doi.org/10.20937/rica.53054>
- Mussakhmetov, A., & Silayev, D. (2025). Esterases: Mechanisms of Action, Biological Functions, and Application Prospects. *Applied Microbiology*, 5(4), 139. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol5040139>
- Nascimento, F. V. do, Lemes, A. C., Castro, A. M. de, Secchi, A. R., & Zarur Coelho, M. A. (2022). A Temporal Evolution Perspective of Lipase Production by *Yarrowia lipolytica* in Solid-State Fermentation. *Processes*, 10(2), 381. <https://doi.org/10.3390/pr10020381>

- Oiza, N., Moral-Vico, J., Sánchez, A., Oviedo, E. R., & Gea, T. (2022). Solid-State Fermentation from Organic Wastes: A New Generation of Bioproducts. *Processes*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/pr10122675>
- Pandey, A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 27(2), 109–117. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(92\)80017-W](https://doi.org/10.1016/0032-9592(92)80017-W)
- Ptaszek, M., Canfora, L., Pugliese, M., Pinzari, F., Gilardi, G., Trzcinski, P., & Malusà, E. (2023). Microbial-Based Products to Control Soil-Borne Pathogens: Methods to Improve Efficacy and to Assess Impacts on Microbiome. *Microorganisms*, 11, 224. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010224>
- Rafeeq, H., Hussain, A., Safdar, A., Shabbir, S., Bilal, M., Sher, F., Franco, M., & Iqbal, H. M. N. (2022). Esterases and Their Industrial Applications. En *Industrial Applications of Microbial Enzymes*. CRC Press.
- Reichhardt, C., Jacobson, A. N., Maher, M. C., Uang, J., McCrate, O. A., Eckart, M., & Cegelski, L. (2015). Congo Red Interactions with Curli-Producing *E. coli* and Native Curli Amyloid Fibers. *PLoS ONE*, 10(10), e0140388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140388>
- Rice, S. A., Koh, K. S., Queck, S. Y., Labbate, M., Lam, K. W., & Kjelleberg, S. (2005). Biofilm Formation and Sloughing in *Serratia marcescens* Are Controlled by Quorum Sensing and Nutrient Cues. *Journal of Bacteriology*, 187(10), 3477–3485. <https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3477-3485.2005>
- Rodriguez-Couto, S., & Sanromán, M. (2006). Application of Solid-State Fermentation to Food Industry – a Review. *Journal of Food Engineering*, 76, 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022>

- Sánchez, A., Oiza, N., Artola, A., Font Segura, X., Barrena, R., Moral-Vico, J., & Gea, T. (2024). Solid-state fermentation: A review of its opportunities and challenges in the framework of circular bioeconomy. *Afinidad. Journal of Chemical Engineering Theoretical and Applied Chemistry*, 81, 51–57. <https://doi.org/10.55815/424209>
- Sánchez, A., Oiza, N., Artola, A., Font, X., Barrena, R., Moral-Vico, J., & Gea, T. (2024). Solid-state fermentation: A review of its opportunities and challenges in the framework of circular bioeconomy. *Afinidad. Journal of Chemical Engineering Theoretical and Applied Chemistry*, 81(601), 51–57. <https://doi.org/10.55815/424209>
- Szymczak, T., Cybulska, J., Podleśny, M., & Frąć, M. (2021). Various Perspectives on Microbial Lipase Production Using Agri-Food Waste and Renewable Products. *Agriculture*, 11(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/agriculture11060540>
- TetraPak. (s/f). *MILK AND WHEY FRACTIONATION* | *Dairy Processing Handbook*. Recuperado el 9 de febrero de 2026, de <http://dairyprocessinghandbook.tetrapak.com/chapter/milk-and-whey-fractionation>
- Uraji, M., Arima, J., Inoue, Y., Harazono, K., & Hatanaka, T. (2014). Application of two newly identified and characterized feruloyl esterases from *Streptomyces* sp. In the enzymatic production of ferulic acid from agricultural biomass. *PloS One*, 9(8), e104584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104584>
- What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050*. (2018). <https://doi.org/10.1596/978-1-4648-1329-0>
- Yafetto, L. (2022). Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. *Heliyon*, 8(3), e09173. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>

